



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

**Caracterización bioquímica, biológica, molecular y
funcional de la enzima hialuronidasa del veneno de la
serpiente peruana *Bothrops atrox* “Jergon de la Selva”**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología
Molecular

AUTOR

Julio César DELGADILLO ARONE

ASESOR

Mg. Edith Fanincia RODRÍGUEZ QUISPE

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Delgadillo, J. (2019). *Caracterización bioquímica, biológica, molecular y funcional de la enzima hialuronidasa del veneno de la serpiente peruana Bothrops atrox "Jergon de la Selva"*. Tesis para optar grado de Magíster en Biología Molecular. Unidad de Posgrado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código Orcid del autor (dato opcional):

Código Orcid del asesor o asesores (dato obligatorio): 0000-0001-6870-9778

DNI del autor: 44231566

Grupo de Investigación: Toxinas de Origen Animal y sus Antivenenos (TOXIVEN)

Institución que financia parcial o totalmente la investigación: Innovate Perú (Contrato 131-FINCYT-IB-2013). Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM- Código de proyecto: B18100531

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación. Debe incluir localidades y coordenadas geográficas: UNMSM-Lima

12° 03'30" Latitud Sur

77° 05'00" Longitud Oeste

Año o rango de años que la investigación abarcó: 3 años



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú. Decana de América



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N° 184-UPG-FCB-2019

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

Siendo las 14:10 horas del día 19.08.2019 en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado de Tesis presidido por:

Dr. Armando Yarleque Chocas	e integrado por
Dra. Fanny Elizabeth Lazo Manrique	(Miembro)
Dr. Dan Erick Vivas Ruíz	(Miembro)
Mg. Edith Fanincia Rodríguez Quispe	(Asesora)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, que solicitara la Bachiller Don **JULIO CÉSAR DELGADILLO ARONE**.

Después de darse lectura al Expediente N° 184-UPG-FCB-19, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado, recepcionaron la exposición de la Tesis Titulada:

“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, BIOLÓGICA, MOLECULAR Y FUNCIONAL DE LA ENZIMA HIALURONIDASA DEL VENENO DE LA SERPIENTE PERUANA *Bothrops atrox* “Jergón de la Selva”, y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú. Decana de América

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: *Muy Bueno con la nota de 18*

A continuación el Presidente del Jurado de Tesis recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el Grado Académico de Magíster en Biología Molecular al señor Bachiller **JULIO CÉSAR DELGADILLO ARONE**.

Siendo las *15:35* se levantó la Sesión, recibiendo el graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, a los 19 días del mes de agosto del año 2019.

Dr. Armando Yarleque Chocas
Profesor Principal a T.C.
PRESIDENTE
REGINA N° 18589

Mg. Edith Fanincia Rodríguez Quispe
Profesora Principal a T.C.
ASESORA
REGINA N° 17149

Dra. Fanny E. Lazo Manrique
Profesora Principal a D. E.
MIEMBRO
REGINA N° 13450

Dr. Dan Erick Vivas Ruíz
Profesor Asociado a T. C.
MIEMBRO
REGINA N° 13418

Dedicatoria

A Dios.

Por haberme ayudado a llegar a este momento y haberme ofrecido buena salud para cumplir con mis objetivos, además de su inmenso amor y sabiduría, por darme la posibilidad de vivir y por estar conmigo en cada meta cumplida que doy, por hacer fuerte mi corazón y aclarar mi mente y por haber puesto en mi vida a todas las personas que han sido mi sostén, fuerza y compañía durante todo este tiempo en que se realizó este trabajo.

Dedicatoria

A mis queridos padres Walter y Ubaldina. Por darme su gran apoyo en todo momento, por sus consejos, por los ejemplos de perseverancia y constancia que siempre los caracterizan y que me han infundado siempre, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mi hermano Walter Jhon por ser el mejor ejemplo de un hermano mayor y del cual aprendí aciertos y superar momentos difíciles; a mis hermanos José y Eliana, por estar conmigo y apoyarme siempre, y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis. ¡Gracias a todos ustedes!

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Armando Yarlequé Chocas, responsable del laboratorio de Biología Molecular por su generosidad al brindarme una vez más la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica, las comodidades para el desarrollo de esta tesis, por haber confiado en mi persona, le agradezco la paciencia, la orientación, el seguimiento, la supervisión continúa durante la elaboración del presente trabajo.

A la Dra. Edith Rodríguez por el seguimiento, asesoramiento y revisión del presente trabajo, agradeciendo su tiempo en las revisiones y correcciones que han sido de gran apoyo para la realización y sustentación de la tesis.

Al Dr. Dan Vivas, mi gran aprecio y mi infinita gratitud por su amistad, orientación, supervisión y apoyo invaluable en el desarrollo y elaboración de este trabajo.

Al Dr. Edgar Gonzalez, mi gran afecto y consideración por las observaciones y sugerencias en la parte molecular de la Tesis.

A la Dra. Fanny Lazo por su gran enseñanza, amistad, confianza, por los consejos, por sus sugerencias, por su ayuda oportuna y su gran colaboración en la revisión de la Tesis.

Al Dr. Ruperto Severino por sus valiosos consejos en mi desarrollo profesional y de esta Tesis.

Al Mg. Gustavo Sandoval por su respaldo, contribución y orientación durante todo el proceso de esta investigación realizada en el laboratorio de Biología molecular.

A los Biólogos: Wolfram Seifert y Luis Ruiz por la continua colaboración y gran compañía que me hicieron durante el desarrollo de este trabajo.

INDICE

	Pág
ABREVIATURAS	VII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABLAS	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
3.1. Hipótesis	19
3.2. Objetivos	19
3.2.1. Objetivo General	
3.2.2. Objetivos Específicos	
4. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1. Material biológico	20
4.2. Material de laboratorio	20
4.3. MÉTODOS	
4.3.1. Caracterización bioquímica de la enzima	25
4.3.2. Ensayos de inhibición de la actividad enzimática y reconocimiento del suero	29
4.3.3. Caracterización biológica de la enzima	29
4.3.4. Ensayos cinéticos.....	31
4.3.5. Caracterización molecular	31
5. RESULTADOS	
5.1. Purificación de la Hyal-Ba y secuenciación aminoacídica	41
5.2. Estabilidad enzimática	43
5.3. Pureza, peso molecular y pH óptimo de la enzima	44

5.4. Efecto de los iones sobre Hyal-Ba.....	46
5.5. Acción de agentes inhibidores	47
5.6. Toxicidad	48
5.7. Actividad difusora <i>in vivo</i> de la Hyal-Ba	48
5.8. Actividad edematosa	49
5.9. Antigenicidad	50
5.10. Análisis Molecular	
5.10.1. Amplificación y secuenciación de la Hyal-Ba	51
5.10.2. Obtención de la secuencia de la proteína	55
5.10.3. Análisis de la proteína deducida	59
5.10.4. Alineamiento múltiple de la Hyal-Ba	63
5.10.5. Análisis filogenético	65
5.10.6. Modelamiento de la estructura de la Hyal-Ba	67
6. DISCUSIÓN	
6.1. Purificación de Hyal-Ba del veneno de <i>B. atrox</i>	70
6.2. Caracterización Bioquímica	74
6.3. Caracterización Biológica	80
6.4. Caracterización Molecular	83
7. CONCLUSIONES.....	87
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

ABREVIATURAS

AH	: Ácido hialurónico.
A.E	: Actividad específica
AcGlcU	: Ácido D- glucurónico.
AcGlcN	: Ácido N-acetil-D-glucosamina.
BCTA	: Bromuro cetil trimetil amonio.
EDTA	: Ácido etilen diamino tetra acético.
GAGs	: Glucosaminoglucanos.
Hyal	: Hialuronidasa
Hyal-Ba	: Hialuronidasa de <i>Bothrops atrox</i> .
INS-Perú	: Instituto Nacional de Salud del Perú.
kDa	: Kilo-Dalton
LAAO	: L- aminoácido oxidasa
mg	: Miligramo
ml	: Mililitro
NaCl	: Cloruro de sodio
ng	: Nanogramo
PAGE-SDS	: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
PSA	: Persulfato de amonio.
SDS	:Dodecil sulfato de sodio
TBE	:Tris –Borato –EDTA
TEMED	: N,N,N,N'tetrametiletilendiamino
Tris	: Tris hidroximetilaminometano

UDF	: Unidades Di-Ferrante.
UTA	: Unidades Totales de Actividad.
µg	: Microgramo
µl	: Microlitro

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Composición del ácido hialurónico por N-acetil- D-glucosamina y ácido D-glucurónico alternantes.....Pág.6
- FIGURA 2. Esquemas de una matriz extracelular intacta y diseminada después de la actividad de la hialuronidasa.....Pág.7
- FIGURA 3. Modelo de la estructura tridimensional de una hialuronidasa en mamíferos y de la hialuronidasa de los venenos basados en la estructura cristizable de la hialuronidasa de *Apis mellifera*..... Pág.13
- Figura 4. (A) La relación filogenética entre las secuencias seleccionadas de hialuronidasas (B) Estructura tridimensional de la hialuronidasa de *Echis pyramidum leakeyi* Pág.15
- FIGURA 5. Relaciones evolutivas de las hialuronidasas de los venenos de serpientes.....Pág.16
- FIGURA 6. Serpiente peruana *Bothrops atrox* “Jergón de la selva” Pág.20
- FIGURA 7. Segmentos de la secuencia consenso.....Pág.36
- FIGURA 8. Perfil de purificación de Hyal-Ba obtenida del veneno de la serpiente peruana *B. atrox*.Pág.42
- FIGURA 9. Efecto de la temperatura sobre la Hyal-Ba de *B. atrox*.....Pág. 44
- FIGURA 10. Estabilidad de actividad Hyal-Ba de *B. atrox*..... Pág.44
- FIGURA 11. Análisis de homogeneidad de Hyal-Ba. Pág.45
- FIGURA 12. pH óptimo de la hialuronidasa de *B. atrox*.....Pág.46
- FIGURA 13. Prueba de toxicidad de Hyal-Ba..... Pág.48
- FIGURA 14. Actividad hemorrágica de la Hyal Ba..... Pág.49
- FIGURA 15. Actividad edemática de la Hyal-BaPág.50
- FIGURA 16. Inmunodifusión doble Pág.51
- FIGURA 17. Electroforesis de amplicones para los Segmentos 2,3,4 y 0 del gen de la hialuronidasa para *Bothrops atrox*.Pág.52
- FIGURA 18. Electroforesis de amplicones para los Segmentos 4, 6,7 y 8 del gen de la hialuronidasa para *Bothrops atrox*. Pág.53

- FIGURA 19. Electroforesis del reamplificado del fragmento 2 del gen de la hialuronidasa para *Bothrops atrox*..... Pág.54
- FIGURA 20. Identificación de los marcos de lectura abierta para Secuencia nucleotídica de Hyal-Ba (ORFfinder).....Pág.56
- FIGURA 21. Secuencia nucleotídica y secuencia aminoácídica inferida de Hyal-Ba.Pág.57
- FIGURA 22. Determinación del péptido señal de la Hyal-Ba.....Pág.59
- FIGURA 23. Análisis de la composición de aminoácidos de la proteína madura..... Pág.62
- FIGURA 24. Determinación de los motivos de N- glicosilación.....Pág.63
- FIGURA 25. Alineamiento de la secuencia inferida de la hialuronidasa de *Bothrops atrox* de Perú con otras hialuronidasas ofídicas.....Pág.64
- FIGURA 26. Árbol filogenético de hialuronidasas de diversas especies... Pág.65
- FIGURA 27. Matriz de Identidad y Árbol Neighbor Joining para Hialuronidasas de diversas especies.Pág.66
- FIGURA 28. Modelamiento de la estructura de Hyal-Ba.....Pág.68
- FIGURA 29. Alineamiento estructural de Hyal-Ba con las estructuras cristalizadas de las hialuronidasas de *Homo sapiens sapiens* y de *Apis mellifera* Pág.69

LISTA DE TABLAS

- TABLA 1. Propiedades bioquímicas y biofísicas de las hialuronidasas.....Pág.10
- TABLA 2. Preparación de la reacción para la obtención del Mix primer-templado.Pág.33
- TABLA 3. Preparación de la reacción para la obtención final de cDNA.... .Pág.34
- TABLA 4. Secuencia de los Primers diseñados de 22 bpPág.35
- TABLA 5. Tamaño de los segmentos de las secuencias consenso para la obtención del gen Hyal-Ba.....Pág.37
- TABLA 6. Preparación del mix de reacción..... Pág.37
- TABLA 7. Cuadro de purificación de Hyal-Ba de *B. atrox*..... Pág.43
- TABLA 8. Acción de iones sobre la actividad enzimática.....Pág.47
- TABLA 9. Acción de agentes inhibidores sobre la actividad de la Hyal-Ba..Pág.47
- TABLA 10. Homología de las secuencias nucleotídica de Hyal-Ba con otras hialuronidasas depositas en el GenBank Pág.55
- TABLA 11. Homología de la secuencia proteica de la Hialuronidasa con otras depositas en el GenBank.....Pág.58
- TABLA 12. Comparación del uso de codón para la enzima hialuronidasa entre especies ofídicas y la enzima L-aminoácido oxidasa de *Bothrops atrox*.....Pág.60
- TABLA 13. Composición de los aminoácidos de Hyal-Ba..... Pág.61
- TABLA 14. Parámetros físicos y químicos conseguidos para la proteína Hyal-Ba por el programa ProtParamPág.62
- TABLA 15. Mutaciones singulares de la hialuronidasa del clado *Bothrops*. Pág.67

RESUMEN

El presente trabajo reporta un estudio a nivel bioquímico, biológico, funcional y estructural de la enzima hialuronidasa del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* “Jergon de la selva”, denominada, Hyal-Ba. Se utilizaron tres pasos cromatográficos para purificar esta enzima, empleando como primer paso una columna de intercambio iónico sobre DEAE Sephadex A-50 seguido de una columna de exclusión molecular sobre Sephadex G-100 y finalmente una columna de Sephadex G-75, ambas equilibradas con buffer acetato de amonio 0.05 M pH 5. El rendimiento de la actividad de Hyal-Ba fue de 29.59 % con un incremento de 36 veces la actividad específica. La enzima representa el 0.86% del contenido total de proteínas en el veneno de *B. atrox*. Los análisis de SDS-PAGE, HPLC y N- Terminal confirman el alto grado de pureza de la enzima. Mediante PAGE-SDS esta enzima mostró 1 banda principal de 69 kDa de peso molecular y su pH óptimo fue de 6.0. A temperatura ambiente la actividad enzimática llega ser nula a las 144 horas. La actividad enzimática se incrementó un 40 % por la adición del ion magnesio (150 mM) y fue inhibida en un 97 y 88 % por EDTA y TLCK (12 mM) respectivamente. En las pruebas biológicas de toxicidad, hemorrágica y edemática se observa que la enzima carece de actividad tóxica, pero incrementa la acción hemorrágica del veneno total sobre la piel de los ratones albinos, no obstante, Hyal-Ba bajo la actividad edemática al disminuir significativamente el edema cuando fue agregada junto con la LAAO. También se midió su inmunoreactividad frente al antiveneno botrópico polivalente por inmunodifusión. Para el análisis de la secuencia nucleotídica de Hyal-Ba se realizaron protocolos de extracción, purificación y obtención de mRNA a partir de veneno fresco, luego su conversión en cDNA y su posterior amplificación por PCR. Los estudios moleculares *in silico* identificaron una secuencia de 2020 pb que codifica una proteína madura de 429 aminoácidos. Adicionalmente el análisis de su estructura primaria reveló 50 kDa como peso molecular y 9.19 como punto isoeléctrico. Se encontró además 6 probables sitios de N-glicosilación (Asn⁶⁷, Asn¹⁰³, Asn¹¹¹, Asn¹⁵³, Asn³⁵⁷ y Asn⁴⁰¹)

Palabras clave: enzima, hialuronidasa, secuencia nucleotídica, serpiente, veneno, *Bothrops atrox*.

ABSTRACT

The present work reports a biochemical, biological, functional and structural study of the hyaluronidase enzyme from the venom of the Peruvian snake *B. atrox* "Jergon", named, Hyal-Ba. Three chromatographic steps were used to purify this enzyme, using a first step in a DEAE Sephadex A-50 ion exchange column followed by a Sephadex G-100 molecular exclusion column and finally in a Sephadex G-75 column, both balanced with 0.05 M buffer ammonium acetate buffer pH 5. The yield of Hyal-Ba activity was 29.59% with an increase of 36 times the specific activity. The enzyme represents 0.86% of the total protein content in the venom of *B. atrox*. The analysis of SDS-PAGE, HPLC and N-Terminal confirm the high degree of purity of the enzyme. By PAGE-SDS this enzyme showed 1 main band weighing 75 kDa and its optimal pH was 6.0. At room temperature the enzymatic activity was null at 144 hours. Enzymatic activity was increased 40% by the addition of the magnesium ion (150 mM) and was inhibited by 97 and 88 % by EDTA and TLCK (12 mM) respectively. In the biological tests of toxicity, hemorrhagic and edemic it is observed that the enzyme lacks toxic activity, but increases the hemorrhagic action of the total venom on the skin of the albino mice, however, Hyal-Ba under edematic activity to the significantly decrease the oedema when it was added in conjunction with the LAAO. Its immunoreactivity was also measured against the polyvalent botropic antivenom by immunodiffusion. For the analysis of the nucleotide sequence of Hyal-Ba, extraction protocols, purification and obtaining of mRNA from fresh venom, its conversion into cDNA and its amplification by PCR were carried out. The *in silico* molecular studies allowed the identification of a 2020 bp sequence that encodes a mature protein of 429 amino acids. Additionally, the analysis of its primary structure indicated a molecular weight of 50 kDa with an isoelectric point of 9.19. We also found 6 probable N-glycosylation sites (Asn⁶⁷, Asn¹⁰³, Asn¹¹¹, Asn¹⁵³, Asn³⁵⁷ and Asn⁴⁰¹).

Key words: Enzyme, hyaluronidase, nucleotide sequence, snake, venom , *Bothrops atrox*.

1. INTRODUCCIÓN

En nuestro planeta existen alrededor de 3000 especies de serpientes siendo del tipo venenosas aproximadamente 640. Según la OMS anualmente suceden 5.4 millones de accidentes ofídicos, de los cuales 2.7 millones ocasionan envenenamiento lo que origina más de 125.000 muertes al año (Theakston *et al.*, 2003). Las serpientes venenosas comprenden a varias familias de serpientes y no forman un solo grupo taxonómico. Esto podría ser explicado como que el veneno en las serpientes surgió más de una vez como consecuencia de una convergencia evolutiva. Los venenos están compuestos de complejas moléculas farmacológicamente activas cuyos efectos biológicos también son complicados ya que los diferentes componentes pueden actuar individual o sinérgicamente, considerando su acción biológica primaria estos pueden separarse en neurotóxicos, miotóxicos, hemorrágicos y citotóxicos (Pereira *et al.*, 2005).

En el Perú que es un país con una fauna ofídica venenosa representativa (33 especies formalmente reportadas) la cual causa un número significativo de casos de ofidismo (MINSA, 2017), aunque todavía no es considerado como problema de salud de gran peligro, los accidentes ofídicos pueden llegar a ser desde invalidantes hasta letales (Zavaleta, 2004) afectando principalmente a las zonas rurales. Las dos grandes familias de estas especies venenosas en nuestro país son la Viperidae y Elapidae (Campbell y Lamar, 1989; Pesantes, 2000 y Yarlequé, 2000).

Dentro de esta fauna ofídica, *Bothrops atrox* es la especie que más casos de ofidismo produce en el Perú (Navarrete *et al.*, 2010), la patología de su envenenamiento se caracteriza por alteraciones a tanto a nivel local (hemorragia, edema, mionecrosis y degradación del tejido conectivo) como sistémico (flictenas, alteraciones hematológicas, hematuria, sangrado gingival, shock hipovolémico y oliguria) (Zavaleta, 2004). La severidad del cuadro de envenenamiento depende mucho de la cantidad, la composición y la rápida diseminación de las toxinas a través del torrente sanguíneo (Van Helden *et al.*,

2014). Asimismo, esta variabilidad también está relacionada a la distribución geográfica (Ortíz *et al.*, 2012, Nuñez *et al.*, 2009).

Aunque hay muchos trabajos sobre el veneno de *B. atrox*, muy poco se conoce acerca de esta especie que habita en el Perú (solo 14 hits in PubMed), la mayoría de estos limitados estudios, están centrados en la caracterización del veneno total y su neutralización. Con respecto a la caracterización de sus componentes, solo es conocida la presencia de la metaloproteasa I (Sanchez *et al.*, 2010) y el inventario realizado por estudios proteómicos (Kohlhoff *et al.*, 2012). Peculiarmente se ha reportado la presencia de una serinoproteasa con acción tipo trombina (Ponce-Soto *et al.*, 2007).

La sintomatología causada por la gran variedad de enzimas tóxicas del veneno, cuya potencia destructiva se acrecenta, debido a su gran velocidad de difusión a través de los tejidos aledaños a la zona de la mordedura a causa de la función de la enzima denominada hialuronidasa o “factor de difusión” (Girish *et al.*, 2004b, Tu y Hendon, 1983 y Watson, 1993). Esta enzima tiene una acción marcada hacia el ácido hialurónico o hialuronano (Kreil, 1995) que actúa como adherente de tejidos y que al ser destrozado favorece a la diseminación de la ponzoña inclusive intensifica la actividad de las demás enzimas como las fosfolipasas PLA₂ (Girish y Kemparaju, 2007).

El hialuronano es un polisacárido de múltiples funciones y es el tipo glicosaminoglicanos que posee un peso molecular alto y ha sido hallado en una gran variedad de organismos procariotas y eucariotas, en los animales se encuentra a nivel de la matriz extracelular del tejido conectivo blando e interviene en diversos procesos biológicos como la fecundación, reproducción, envejecimiento, comunicación celular e inclusive en la aparición de tumores (Jhonston y Mixner, 1950; Stern, 2008).

El conocimiento que se tenía de las hialuronidasas en ponzoñas ofídicas, en décadas pasadas fue escasa pese a su repercusión en muchos procesos biológicos (Watson, 1993) e incluso ahora en muchos grupos de serpientes venenosas se desconoce la acción y función completa de esta enzima. Actualmente hay una gran polémica en relación a como se formaron las hialuronidasas por lo que se investiga su aparición en las taxas animales

variadas desde especies de invertebrados hasta mamíferos, también tiene trascendencia por su gran capacidad farmacológica que muestra. Entre los desafíos que confronta este trabajo con la enzima hialuronidasa es su restringida verificación en las ponzoñas ofídicas, la carente estabilidad con respecto a la temperatura y tiempo, además sobre la eficacia de los métodos y protocolos que existen para cuantificar la actividad de la enzima hialuronidasa.

Con el fin de utilizar los venenos como potencial terapéutico para aplicaciones médicas, estudios anteriores se han centrado más en los componentes tóxicos del veneno que en los componentes no tóxicos como es el caso de la enzima hialuronidasa (Kreil, 1995). Como se mencionó anteriormente se ha demostrado que la hialuronidasa, así como los fragmentos degradados del ácido hialurónico, tienen efectos biológicos interesantes no sólo en la anti-angiogénesis, la invasión, motilidad celular y en la reparación de heridas (Tempel *et al.*, 2000; 2006, Dechert *et al.*, 2006), sino también se sabe que desempeñan un papel importante en la quimioterapia contra el cáncer de tumores sólidos. La aplicación de la hialuronidasa en quimioterapia puede mejorar el control inmunológico de los cánceres por degradación de hialuronano, especialmente para aquellos tumores que están recubiertos con abundante ácido hialurónico unido a CD44 (Spruß *et al.*, 1995).

El presente estudio se enfoca en esta enzima perteneciente a la serpiente peruana *Bothrops atrox*, de la que se han caracterizado algunas propiedades (Gonzalez *et al.*, 2013), también se ha estudiado algunas propiedades bioquímicas y biológicas de las hialuronidasas de las serpientes peruanas *Lachesis muta* “Shushupe” (Hurtado *et al.*, 2007) y *Bothrops brazili* (Delgadillo *et al.*, 2013). Estudios a nivel molecular sobre esta enzima en Sudamérica, en especial en el género *Bothrops* es escasa. Castanheira en el año 2014 realizó un primer reporte de una secuencia de cDNA de la hialuronidasa del veneno de la serpiente brasileña *Bothrops neuwiedi pauloensis*, ya que el análisis *in silico* de su secuencia de aminoácidos deducida abrirá nuevas perspectivas sobre la función biológica de las proteínas similares a la hialuronidasa y puede dirigir estudios adicionales que comprendan su aislamiento y/o producción recombinante, así como su caracterización estructural y funcional.

Recientemente se ha reportado dos isoformas de esta enzima en la serpiente brasileña *Bothrops mooejeni* (Gobbi *et al.*, 2017).

Con el desarrollo de nuevas tecnologías se diseñará mejores antídotos ofídicos idóneos para contrarrestar la toxicidad de los venenos y auxiliar la vida humana, pero se ha rezagado la inhibición de los daños locales aledaños a la mordedura provocado por la hialuronidasa surgiendo muchas veces en un pago extra para los pacientes en cirugías reconstructivas (Girish *et al.*, 2002).

El presente trabajo, busca incrementar el conocimiento acerca de las características bioquímicas, biológicas de la hialuronidasa de *Bothrops atrox* e iniciar los primeros estudios moleculares y funcionales de esta enzima, ya que nuestros resultados darán luces para un mejor entendimiento de la estructura de esta enzima y su funcionabilidad en el proceso de envenenamiento, lo cual puede contribuir a la optimización de las estrategias empleadas en las terapias para los accidentes ofídicos causados por *Bothrops atrox*.

2. ANTECEDENTES

El ácido hialurónico es un glicosaminoglicano no sulfatado de carga negativa y que posee un peso molecular alto de aproximadamente 6 millones de Daltons, esta ubicado primordialmente en la matriz extracelular (MEC), pero también ha sido localizado en el citoplasma, núcleo y nucléolo, modificándose en un polímero con una colaboración excepcional en varios procesos metabólicos, desde la fertilización hasta el crecimiento y metástasis tumoral (Lokeshwar *et al.*, 2008), se ha encontrado especialmente en el tejido conectivo de la mayoría de los vertebrados, también se encuentran en las cápsulas de algunas bacterias (Stern, 2004; Prehm, 1984, 1990, 2006; He *et al.*, 2009). La estructura química del ácido hialurónico consiste de unidades repetitivas de disacáridos unidos por enlaces glicosídicos β -1,4. Cada unidad disacárida está formada por ácido D-glucurónico (AcGlcU) y ácido N-acetil-D-glucosamina (AcGlcN) conectados por enlaces glicosídicos β -1,3.

La hialuronidasa o hialuronato glicanohidrolasa es una enzima endo- β -glicosidasa considerablemente repartida en la naturaleza (Manzel y Farr, 1998; Girish y Kemparaju, 2007). Esta enzima se ha encontrado en varios órganos y fluidos corporales humanos (Gregory *et al.*, 1996), y en las secreciones de virus (Gregory *et al.*, 1996; Csoka *et al.*, 1997), hongos (DeAssis *et al.*, 2003; Shimuzu *et al.*, 1996), bacterias (Hynes y Walton, 2000; Sutherland, 1995), bacteriófagos (Ponnuraj y Jedrzejas, 2000; Baker *et al.*, 2002; Allen *et al.*, 2004; Makriz *et al.*, 2004), nemátodos (Hotez *et al.*, 2000) y sanguijuelas (Hovingh y Linker, 1999; Frost *et al.*, 1996), también se encuentran en los venenos de serpientes (Pukrittayakamee *et al.*, 1988; Tan y Tan, 1988; Girish *et al.*, 2004; Girish y Kemparaju, 2005, etc), escorpiones (Pessini *et al.*, 2001; Morey *et al.*, 2006), abejas (Markovic-Housley *et al.*, 2000), avispas (Kreil, 1995), avispones (Lu *et al.*, 1995), arañas (Wright *et al.*, 1973; Schanbacher *et al.*, 1973; Rash y Hodgson, 2002; Barbaro *et al.*, 2005, Nagaraju *et al.*, 2006), peces (Ng *et al.*, 2005) y lagartos (Tu y Hendon, 1983).

En estos últimos años las hialuronidasas han tenido mucho interés por su importante papel en la regulación del metabolismo del ácido hialurónico y cuando

ocurre la sintomatología por envenenamiento. Las hialuronidasas pertenecen a las hidrolasas glucosídicas (GHs), una subfamilia de enzimas que están implicadas en el metabolismo de los carbohidratos. Las funciones biológicas de la hialuronidasa y los mecanismos de acción no habían sido muy claros durante muchas décadas (Kreil, 1996; Stern y Jedrzejewski, 2006).

Duran-Reynals estudió en 1928 un principio difusor descubiertos en determinadas cepas bacterianas de estreptococos. Luego este factor o principio o factor fue reconocido como una enzima teniendo una acción preponderante sobre el ácido hialurónico y que luego se nombró como hialuronidasa (Meyer, 1971). Lisanti, en 1950 investigó esta enzima que se encuentra en la saliva de humanos, a partir de este trabajo varias hialuronidasas en diferentes grupos de animales se han estudiado (Girish y Kemparaju, 2007).

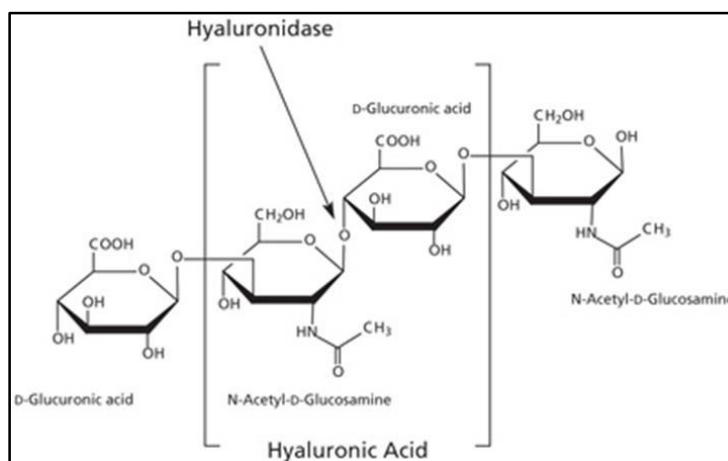


FIGURA 1. Composición del ácido hialurónico por N-acetil- D-glucosamina y ácido D-glucurónico alternantes.

La hialuronidasa presente en venenos ofídicos integra el grupo de las hialuronato glicanohidrolasas (glicosidasas) que desintegran el ácido hialurónico a tetrasacaridos y hexasacaridos, también ejercen su acción en sulfatos de condroitina (Etesse *et al.*, 2009). La enzima en estudio llega a ser un factor decisivo en la desintegración del ácido hialurónico y también en el accidental daño de la constitución de la membrana extracelular de los tejidos conectivos que están alrededor de los vasos sanguíneos, facilitando el ingreso de los factores tóxicos del veneno a la circulación como también de su expansión sobre los tejidos aledaños a la herida causada por la mordida (Kemparaju y Girish, 2006).

La acción de la hialuronidasa sobre el ácido hialurónico es activada por dos residuos ácidos, en la que uno puede actuar como donador de protones (un ácido general) mientras que el otro puede actuar como nucleófilo / base (Davies y Henrrisat, 1995). Los polímeros del ácido hiaurónico son un componente integrado de la matriz extracelular, cartílago, tejidos conectivos, líquido sinovial, tejidos y piel (Figura 2). Estos polímeros de ácido hiaurónico y sus posteriores productos de degradación participan en procesos celulares como la diferenciación celular, la progresión tumoral, los procesos inflamatorios, la adhesión celular, la angiogénesis, la señalización, los daños en los tejidos y los mecanismos de reparación (Termeer *et al.*, 2003 ; Toole ,2004 ; West *et al.*,1985 ; Noble, 2002).

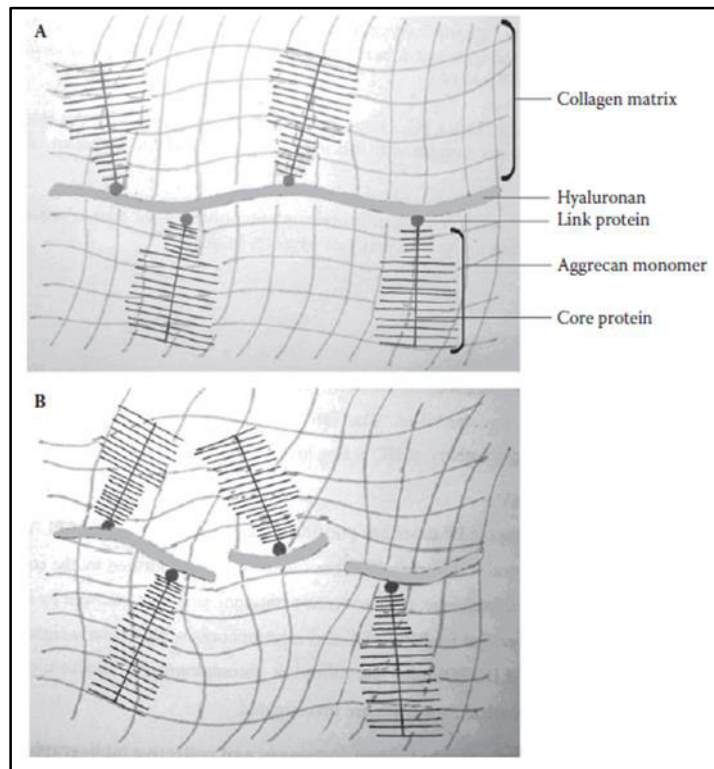


FIGURA 2. Esquemas de una matriz extracelular intacta (A) y diseminada (B) después de la actividad de la hialuronidasa (Girish,2004)

La primera clasificación de las hialuronidasas fue establecida de acuerdo a su mecanismo catalítico y su origen encontrándose tres principales familias, esta

clasificación se basaba en sustratos específicos y en el análisis bioquímico de la enzima y sus productos de reacción (Meyer, 1971).

Dentro del primer grupo están las hialuronato 4-glicanohidrolasas o también denominada endo β -N-acetilhexosaminidasas (EC 3.2.1.35) que hidrolizan los enlaces glicosídicos β -1,4, dando tetrasacáridos y hexasacáridos como principales productos finales. Dentro de este grupo tenemos a las hialuronidasas de lisosomas, espermatozoides y los encontrados en los venenos de serpientes y abejas. En el segundo grupo están las hialuronato 3-glicanohidrolasas (endo β -glucuronidasas EC 3.2.1.36) que hidrolizan los enlaces glicosídicos β -1,3, dando tetrasacáridos y hexasacáridos: AcGlcN-AcGlcU-AcGlcN-AcGlcU, como principales productos finales. En este grupo se encuentran las hialuronidasas de la glándula salival de las sanguijuelas, anquilostomas y crustáceos. Por último, tenemos al grupo de las hialuronato liasas (endo β -N-acetilhexosaminidasas EC 4.2.2.1) que hidrolizan los enlaces glicosídicos β -1,4, dando disacáridos como productos finales, dentro de este grupo están las hialuronidasas de varios microorganismos (Meyer, 1971) esta clase de enzimas también clivan el mismo sustrato de ácido hialurónico pero con un motivo estructural diferente (dominio α y β) y de mecanismo de acción (eliminación β), han sido estudiados a partir de las especies de *Streptococcus pneumonia* (Jedrzejewski *et al.*, 2002) ya que es uno de los principales factores virulentos que es responsable de la invasión bacteriana por degradación de ácido hialurónico.

Actualmente se discute sobre el origen evolutivo de la hialuronidasa ya que las encontradas en los venenos de diferentes especies del grupo animal poseen semejanzas estructurales con la hialuronidasa que está localizada en los espermatozoides de los mamíferos (Gmachl *et al.*, 1993). Esta enzima en los mamíferos tiene asociaciones a GPI (glicosil-fosfatidil inositol) y es identificado como PH-20 el cual se reportó a inicios de los 60 y que participan en el proceso de fecundación (Garvin *et al.*, 1974; Johnston y Mixner, 1950).

Los estudios bioquímicos han reportado la caracterización de esta enzima en el veneno de escorpiones, abejas, avispones, arañas, peces piedra y especies de serpientes (Markovic *et al.*, 2000; Ramanaiah *et al.*, 1989; Lu y Kochoumian., 1995; Wright *et al.*, 1973; Poh *et al.*, 1992; Girish *et al.*, 2004) (Tabla 1).

Esta enzima también es reconocida por ser el alérgeno mas importante del veneno desarrollado por abejas, avispas y escorpiones que incitan severas respuestas sistémicas mortales intercedidas por IgE en humanos (Morey *et al.*, 2006), esto aclara su accionar como un inmunógeno útil cuando se desarrolla altos títulos de inmunoglobulinas y reacciones alérgicas al ser suministrado en animales de experimentación (Matysiak *et al.*, 2011).

Por otro lado, las hialuronidasas presentes en venenos de artrópodos varían en la cantidad en que se encuentran, así como en su estructura molecular, por ejemplo, llega a hacer el principal componente alérgeno del veneno de abeja, *Apis mellifera* (Markovic-Housley *et al.*, 2000), también se pueden encontrar en *Aedes aegypti* y *Glossina fuscipes* “Mosca tse-tse” donde figuran en más del 20% del proteoma encontrado en sus glándulas salivales (Volfova *et al.*, 2008). Las hialuronidasas de algunos hexápodos como los encontrados en *Phlebotomus* y *Lutzomyia* tienen una acción biológica que irrita las heridas epidérmicas provocadas por *Leishmania major* (parasito transferido por la picadura de estos hexápodos) y acrecenta con notoriedad las infecciones producidas por estos parásitos. (Volfova *et al.*, 2008).

También se han encontrado hialuronidasas tanto en el veneno de la mantaraya (*Potamotrygon motoro*), en arañas, cefalópodos y otros moluscos (Magalhaes *et al.*, 2008; Silveira *et al.*, 2007 y Fry *et al.*, 2009).

TABLA 1. Propiedades bioquímicas y biofísicas de las hialuronidasas encontradas en venenos animales (modificado y actualizado por Kemparaju y Girish, 2006)

Source	M.W. (kDa)	pI	Optimum pH	Optimum Temp. (°C)	Kinetic para. K_m ($\mu\text{g/mL}$); V_{max} ($\mu\text{g/min}$)	Final digested hyaluronan fragment	Structural info.	Ref.
<i>A. acutus</i> (snake)	33	10.3	3.5~5.0	37	6.2; N.D.	N.D.	N.D.	Xu et al., 1982
<i>A. contortrix contortrix</i> (snake)	59.3	9	6	37	N.D.	Tetrasaccharide	N.D.	Kudo and Tu, 2001
<i>N. naja isoform 1</i>	70.4	9.2	5	37	N.D.	Tetrasaccharide	10 a.a. of N-terminal	Girish et al., 2004
<i>isoform 2</i> (snake)	52	9.7	5	37	N.D.	N.D.	N.D.	Girish and Kemparaju, 2005
<i>H. fulvipes</i> (scorpion)	82	N.D.	4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Ramanaiah et al., 1990
<i>T. serrulatus</i> (scorpion)	51	N.D.	6	40	69.7; 3.3	N.D.	N.D.	Pessini et al., 2001
<i>A. mellifera</i> (bee)	41	9	6	37	N.D.	Tetrasaccharide	Full primary and 3-D	Kemeny et al., 1984; Gmachl, and Kreil; 1993; Marković-Housley et al., 2000
<i>S. horrida</i> (fish)	62	9.2	6	37	709; 13.1	N.D.	Full primary	Poh et al., 1992; Ng et al., 2005
<i>H. horridum horridum</i> (lizard)	63	5	5	Sensitive	N.D.	N.D.	N.D.	Tu and Hendon, 1983
<i>L. obliqua isoform 1</i>	49	N.D.	6~7	37	N.D.	N.D.	N.D.	da C B Gouveia et al., 2005
<i>isoform 2</i> (caterpillar)	53	N.D.	6~7	37	N.D.	N.D.	N.D.	da C B Gouveia et al., 2005
<i>L. reclusa isoform 1</i>	33	N.D.	5~6.6	37	N.D.	N.D.	N.D.	Wright et al., 1973
<i>isoform 2</i> (spider)	63	N.D.	5~6.6	37	N.D.	N.D.	N.D.	Wright et al., 1973
<i>Palamneus gravimanus</i> (scorpion)	52	N.D.	4.5	37	47.61; 1.49	N.D.	N.D.	Morey et al., 2006
<i>Tityus stigmurus</i> (scorpion)	44.8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	24 a.a. of N-terminal	Batista et al., 2007
<i>Echis ocellatus</i> (snake)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Full primary	Harrison et al., 2007
<i>Potamotrygon motoro</i> (fish)	79	N.D.	4.2	40	4.91; 2.02*	N.D.	N.D.	Magalhães et al., 2008
<i>Vitalius dubius</i> (spider)	45	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Rocha-e-Silva et al., 2009
<i>Loxosceles intermedia isoform 1</i>	41	N.D.	6~8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	da Silveira et al., 2007
<i>isoform 2</i> (spider)	43	N.D.	6~8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	da Silveira et al., 2007
<i>Hippasa partita</i> (spider)	42.26	N.D.	5.8	37	N.D.	N.D.	N.D.	Nagaraju et al., 2007
<i>BmHYA1</i>	48.7	8.65 **	4.5	50	95.3; 3.9	Tetrasaccharide	Full primary	Present work

*: unit of U/min; **: calculated; N.D.: not determined; a.a.: amino acid residues.

Los primeros investigadores que observaron la actividad de esta enzima en extractos acuosos de testículos de mamíferos la denominaron como un “factor difusor” ya que promovía la diseminación de tintes inyectados subcutáneamente (Hoffman y Duran Reynals, 1931), luego se evidenció la misma actividad difusora cuando se hicieron trabajos con venenos de serpientes y arañas (Duran Reynals, 1936, 1939). Desde entonces se ha encontrado actividad hialuronidasa en los Viperidos y Elapidos, observándose un incremento de la permeabilidad de los tejidos después de la inyección del veneno (Duran Reynals, 1939; Favilli, 1940;

Tarabini- Castellani, 1940; Chain y Duthie, 1940). También se observó que la enzima se encuentra en mayor proporción y con acción considerable en los venenos de los vipéridos y crotálidos, mientras que en los elápidos generalmente está ausente o en bajas concentraciones (Zeller, 1948; Favilli, 1956).

Se estudio en 1966 la acción de la hialuronidasa del veneno de la cobra de Formosa *Naja naja atra* (Chiu, 1960) y posteriormente se intentó por medio de técnicas cromatográficas, separar la enzima de la fracciones tóxicas de los venenos de *Naja oxiana* y *Naja atra atra* (Turakulov *et al.*, 1969), resultando en ambos casos una purificación parcial y estableció el primer reporte de su probable escasez tóxica, observándose también su función como coadyuvante del veneno ofídico al permitir su diseminación en los tejidos. También en las serpientes egipcias, como *Naja haje* y *Naja nigricolis*, se evaluó la actividad hialuronidasa, encontrándose que la enzima era termolábil y rápidamente inhibida por algunas sales como gentisato sódico, pero no era inhibida por EDTA (Mohamed *et al.*, 1973).

En 1982, Xu *et al.*, trabajaron en la purificación parcial y caracterización bioquímica de la hialuronidasa de la ponzoña de la serpiente *Agkistrodon acutus acutus*, utilizándose tres columnas cromatográficas con los geles CM Sephadex C-50, Sephadex G-75 y CM Sephadex C-25, trabajo que sirvió de punto de partida para la purificación de la hialuronidasa del veneno del lagarto *Heloderma horridum horridum*, evidenciándose también su capacidad difusora (Tu y Hendon, 1983). También se obtuvieron dos hialuronidasas de la ponzoña de *Agkistrodon contortrix contortrix* siendo 59 kDa y 61 kDa sus pesos moleculares (Kudo y Tu, 2001). Así mismo, para obtener la hialuronidasa de la cobra africana *Naja naja* se empleó una columna de Sephadex G-75 seguida de CM Sephadex C-25 hallándose dos isoformas de esta hialuronidasa nombradas NNH1 y NNH2 (Girish 2004, Girish *et al.*, 2005a).

Se vienen investigando en el Perú los venenos de serpientes debido a su gran repercusión en incidentes de ofidismo (Yarleque, 2000). Se analizó la enzima hialuronidasa correspondiente al veneno de *L. muta* en un solo paso mediante cromatografía de intercambio iónico (Lerma, 2006 y Hurtado *et al.*, 2006),

también se estudió algunas propiedades bioquímicas y purificación parcial de esta enzima en los venenos de las serpientes *Bothrops atrox* y *Bothrops brazili* (Gonzalez *et al.*, 2013; Delgadillo *et al.*, 2013), se ha realizado una constante revisión de la metodología de purificación debido a la inestabilidad térmica de la enzima.

Entre los trabajos tanto a nivel genómico como proteómico se tiene el estudio de la hialuronidasa de *Synanceja horrida* “pez piedra” que se encontraría ubicada en el grupo PH-20 de las hialuronidasas, como señalan los análisis *in silico* a partir del cDNA (Cheong *et al.*, 2005); También se han aislado proteínas similares a hialuronidasas a partir de testículo de ratón que serían semejantes a las enzimas del grupo PH-20 (Reitinger *et al.*, 2007; Hofinger *et al.*, 2008). Se halló un elevado nivel de identidad de las especies de ofidios *Bitis arietans*, *Cerastes cerastes* y *Echis ocellatus* que fue superior al 95%, que fue analizado de las secuencias de cDNA que se consiguieron mediante PCR (Harrison *et al.*, 2007), ya que fueron aisladas a partir de las glándulas venenosas de estas serpientes procedentes de Kenya, Egipto y Nigeria. Esto es importante desde el punto de vista evolutivo ya que permite relacionar las similitudes estructurales con la historia evolutiva de estas moléculas. Con esa información Harrison construyó un modelo hipotético estructural que compartirían las enzimas de este tipo provenientes de vipéridos, lo cual se pone a discusión por ser el primer trabajo de este tipo y por el hecho de emplear vipéridos de solo un continente.

Otro punto importante es que se encuentra en revisión la metodología empleada en el estudio de esta enzima (El-safory *et al.*, 2010), por ejemplo, en el veneno de abeja (*Apis*) analizado mediante MALDI-TOF y nanoESI-QqTOF, ambos son métodos de espectrometría de masas, donde se obtuvieron resultados más precisos y detallados que en estudios previos que se emplearon para descifrar los mecanismos sobre el funcionamiento de estas proteínas (Matysiak *et al.*, 2011).

La estructura cristalina de la hialuronidasa humana y de la abeja ya está estudiada, pero su mecanismo de acción aún no está claro (Chao *et al.*, 2007) (Markovic *et al.*, 2000) (Figura 3). Estas estructuras estaban de acuerdo con la propuesta de ácido-base o doble mecanismo de desplazamiento de acción de la enzima. A partir del análisis tanto de la estructura como de la secuencia, se

reveló que tenían una forma y tamaño similares de la cavidad de unión al sustrato y compartían una identidad de secuencia del 32,13%. La unión del sustrato es favorecida por interacciones electrostáticas (Arg y Lys en la región del sitio activo con el grupo carboxílico del ácido hialurónico) e hidrofóbicas (Tyr en la cavidad a las regiones hidrofóbicas del ácido hialurónico). Un estudio a nivel de una mutación funcional en el espermatozoide humano PH-20, identificó Asp146 y Glu148 (como posibles donadores de protones) que son equivalentes a Asp111 y Glu113 de 1FCV (estructura cristalina de la hialuronidasa del veneno de abeja) como los residuos catalíticos más importantes de las hialuronidasas (Arming *et al.*, 1997).

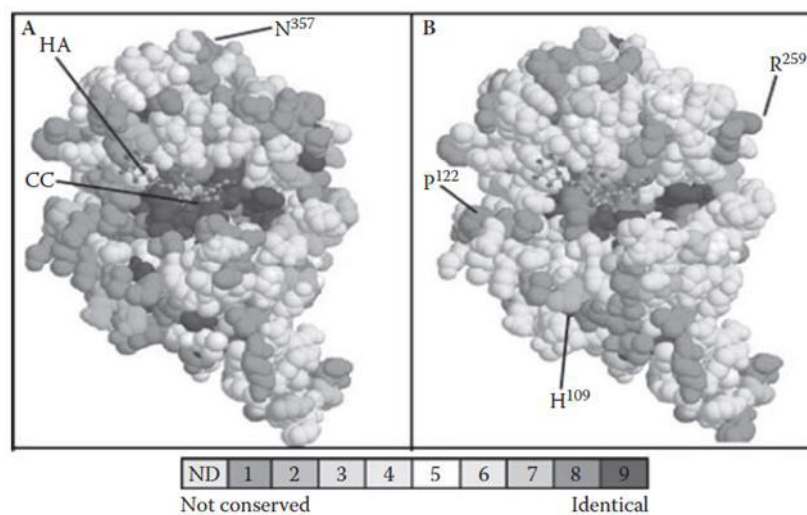


FIGURA 3. Modelo de la estructura tridimensional de una hialuronidasa en mamíferos (A) y de la hialuronidasa de los venenos basados en la estructura cristalizable de la hialuronidasa de *Apis mellifera*. Las imágenes están orientadas a mostrar el sitio catalítico hendido (CC) de unión a hialuronano (HA), y el sombreado indica las partes externas de los residuos conservados (Harrison *et al.*, 2007)

Las mordeduras de serpientes son un problema socioeconómico común que afectan a más de 4.5 millones de personas anualmente en todo el mundo. La hialuronidasa de las serpientes, es el factor principal que influye más en el daño tisular local y potencia la rápida difusión del veneno. Si esta enzima es neutralizada antes, la propagación de proteínas tóxicas y sus efectos se pueden

reducir drásticamente, la búsqueda de un fármaco líder o sueros contra esta enzima ayudará y mejorará la terapia anti-veneno cuando se administre antes o junto con los tratamientos disponibles. Se han estudiado algunos compuestos vegetales como: el ácido aristolóquico, la indometacina, la quercetina, la curcumina, el ácido tánico y la flavona que mostraron una neutralización eficaz frente a la hialuronidasa de la serpiente *Naja naja*, también se observó la demora de la propagación del veneno y disminución de la letalidad (Girish y Kemparaju., 2005 ; Santhosh *et al.*, 2013).

Sólo un número limitado de estudios bioquímicos y biológicos de esta enzima se conocen, pero a nivel estructural, su funcionabilidad y mecanismo de inhibición todavía no está bien definida. Por lo tanto, se han realizado estudios de análisis filogenéticos, mecanismos de unión por inhibidor y el comportamiento conformacional de la hialuronidasa de *Echis pyramidum leakeyi* (EHY) (Bharathi *et al.*, 2016) los cuales demostraron la existencia de dos grupos funcionales de hialuronidasa que se habían separado de la serpiente coral (ancestro). La estructura fue modelada y se encontró que la región E-loop (211-224 aa) sólo estaba presente en EHY en comparación con los demás que pueden explicar la función significativa de hialuronidasas de víboras. (Figura 4).

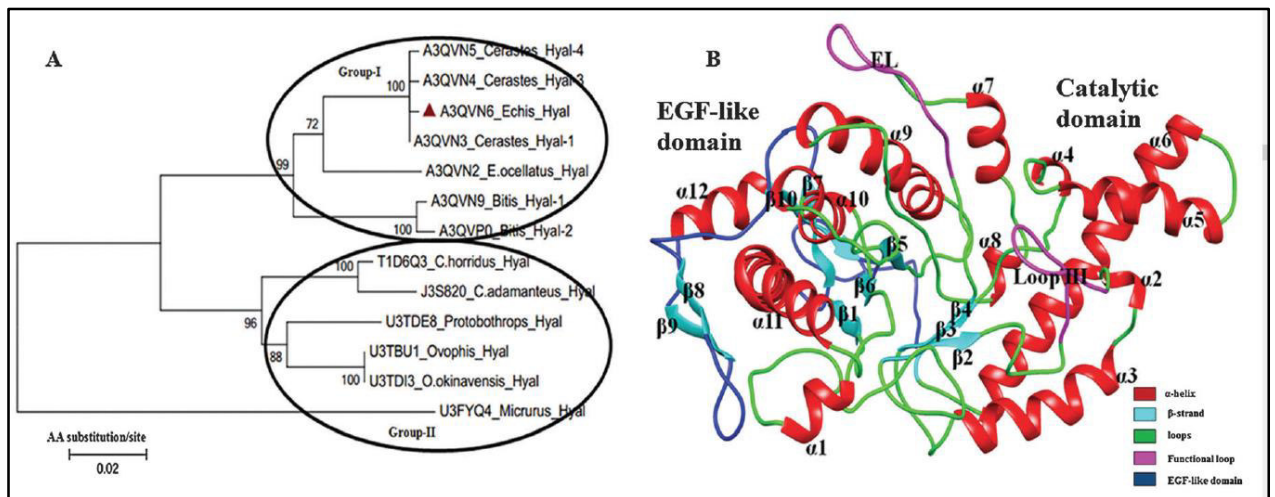


Figura 4. (A) Relación filogenética entre las secuencias seleccionadas (UniProt ID y el nombre corto de cada especie que se menciona) fue inferida por el método de máxima verosimilitud apoyado en el modelo de matriz JTT, utilizando MEGA5 y MSA realizado usando ClustalX. (B) Estructura tridimensional de EHY. Los bucles de región de dominio catalítico se resaltan en verde, los bucles de dominio similares a EGF se resaltan en azul y la hélice y las hojas beta están en rojo y cianico respectivamente. La región de loop-III y E-loop son funcionalmente importante se resaltan en magenta.

Estudios a nivel molecular sobre esta enzima en Sudamérica en especial del género *Bothrops* es escaso, se ha realizado un primer reporte de una secuencia de cDNA de la hialuronidasa de la ponzoña de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, ya que el análisis *in silico* de su secuencia de aminoácidos deducida abre nuevas perspectivas sobre la función biológica de las proteínas similares a hialuronidasas y puede dirigir estudios adicionales que comprendan su aislamiento y/o producción recombinante, así como su caracterización estructural y funcional (Castanheira *et al.*, 2014) (Figura 5) y recientemente se ha encontrado a partir del primer transcriptoma de la serpiente brasileña *Bothrops mooejeni* dos isoformas de la hialuronidasa: BmooHyal-1 y BmooHyal-2 (Gobbi *et al.*, 2017).

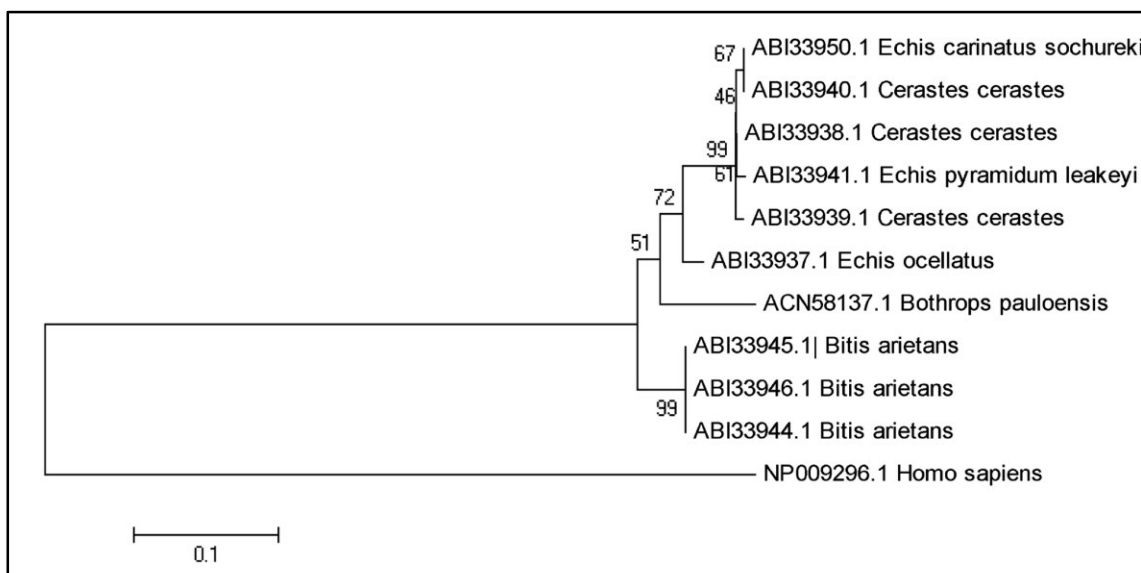


FIGURA 5. Relaciones evolutivas de las hialuronidasas de los venenos de serpientes inferidas usando el método de Neighbor-Joining. (La Hyal humana fue empleada como un grupo externo)

La importancia y las aplicaciones de la hialuronidasa en la terapia del cáncer ha sido reconocida por largo tiempo por los investigadores biomédicos y clínicos por igual. En un número de estudios clínicos piloto, se informó previamente que el uso de hialuronidasas como un complemento a la quimioterapia convencional mejoró significativamente el pronóstico de la mayoría de los pacientes. En algunos casos, el tratamiento suplementario con la enzima incluso indujo respuestas significativas en pacientes previamente quimiorresistentes. (Beckenlehner *et al.*, 1992, Smith *et al.*, 1997, Klocker *et al.*, 1998). Se supuso que la degradación del hialuronato enriquecido en la matriz extracelular por las hialuronidasas podría haber facilitado al fármaco para ejercer fácilmente su acción sobre el blanco. Beckenlehner *et al.*, (1992) estudiaron el efecto de la hialuronidasa sobre la actividad de la adriamicina en modelos de cáncer de mama tanto en los estudios *in vitro* como *in vivo* se demostró que la actividad de la adriamicina aumento significativamente *in vitro* como *in vivo*. Se teoriza que esta enzima favorece la difusión de la adriamicina haciendo un espacio hidratado en las células. El crecimiento del tumor fue indirectamente inhibido por una mayor accesibilidad del quimioterapéutico. También se encontró de que la hialuronidasa añadida exógenamente reprimió el crecimiento del tumor mediante la hidrolización del halo de ácido hialurónico que rodeaba las células tumorales,

y se infiere que la CD44 podría estar implicada en este proceso ya que la glicoproteína transmembrana CD44 es la molécula de adhesión celular, ampliamente distribuida a través de la membrana celular que está implicada en una serie de eventos biológicos tales como adhesión celular, invasión de células cancerígenas y migración (Naor *et al.*, 1997). La interacción CD44- ácido hialurónico es importante para el crecimiento y progresión del cáncer (Platt y Szoka, 2008) comprobándose que la interferencia de la interacción de CD44 - ácido hialurónico por la hialuronidasa, a través de la interrupción de la matriz del ácido hialurónico, disminuye eficazmente el crecimiento tumoral (Shuster *et al.*, 2002).

Parece que el rol de la hialuronidasa puede ser tanto el promotor como el supresor de los tumores. El papel que desempeñan las hialuronidasas en la biología del cáncer está todavía en cuestión (Lokeshwar y Selzer, 2008). Las hialuronidasas también pueden mostrar efectos indirectos por los fragmentos degradados de ácido hialurónico, que son de hecho polisacáridos de diferentes tamaños y juegan un papel a través de la interacción con los receptores de la membrana celular como CD44 y RHAMM. Por ejemplo, la escisión proteolítica de CD44 por los fragmentos de hialuronano de bajo peso molecular pueden mejorar la motilidad de las células tumorales (Stern *et al.*, 2006).

Los fragmentos de ácido hialurónico de alto peso molecular (> 400 kDa) juegan un papel como anti-angiogénicos, antiinflamatorios e inmunosupresores, mientras que los fragmentos medianos (~ 20 kDa que contienen ~ 50 unidades de sacárido) pueden dar lugar a la síntesis de citoquinas inflamatorias. Por otro lado, los fragmentos pequeños de peso molecular (6 ~ 20 kDa) pueden estimular a las células dendríticas y a las células presentadoras de antígeno en el sistema inmunológico y pueden tener un efecto sobre los procesos angiogénicos, inflamatorios e inmunoestimuladores (Stern, 2005). También se han detectados fragmentos de degradación de hialuronano relativamente pequeños que contienen 3-10 disacáridos entre los productos de degradación de hialuronidasas. Este grupo de fragmentos de hialuronano inhibe el anclaje en el crecimiento independiente de las células tumorales. Por ejemplo, los tetrasacáridos, los principales productos de la HYA-1 humana, tienen actividades

anti-apoptóticas, suprimiendo la muerte celular en células cultivadas sometidas a hipertermia o inanición de suero (Stern, 2005). Los fragmentos de peso molecular más altos están a menudo presentes en el proceso biológico normal, mientras que los fragmentos de peso molecular bajos aparecen frecuentemente en cánceres (Kumar *et al.*, 1989; Lokeshwar *et al.*, 1997).

Finalmente se ha encontrado metodologías similares en trabajos sobre células madre donde se investiga el papel principal que cumple la hialuronidasa y su implicación en la comunicación y muerte celular además de otras moléculas importantes en el metabolismo celular y cáncer (Prestwich *et al.*, 2011). El panorama para la posteridad es permitir utilizar la información completa de las hialuronidasas para el provecho de las personas tanto en la medicación de enfermedades vinculadas a carbohidratos, matriz extracelular, cáncer y en su inhibición segura para disminuir las lesiones locales debido a las mordeduras de serpientes y otros animales venenosos. La ausencia de diversidad molecular y el comportamiento estructural y funcional de la hialuronidasa de los venenos de la mayoría de serpientes sobre todo de la especie *Bothrops atrox* fue la inspiración para el objetivo de este estudio.

3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

- **Hipótesis nula:** La hialuronidasa del veneno de *Bothrops atrox*, no es un agente difusor del sistema de toxinas y no degrada al ácido hialurónico.
- **Hipótesis alternativa:** La hialuronidasa del veneno de *Bothrops atrox*, es un agente difusor del sistema de toxinas y degrada al ácido hialurónico.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. Objetivo General

- Caracterizar a nivel estructural y funcional al principal factor difusor de los componentes del veneno de la serpiente *Bothrops atrox*.

3.2.2. Objetivos Específicos.

- Establecer un procedimiento cromatográfico para la purificación de Hyal-Ba.
- Caracterizar bioquímica y biológicamente a la Hyal-Ba.
- Aislar RNA total a partir del veneno fresco y obtener cDNA de la serpiente peruana *Bothrops atrox*.
- Caracterizar molecularmente a la Hyal-Ba a partir de su secuencia nucleotídica.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material Biológico

4.1.1. Veneno

Se empleó el veneno extraído fresco y liofilizado de especímenes adultos de la vibora peruana *Bothrops atrox*, originarios de Pucallpa conservados en el serpentario “Oswaldo Meneses” del Museo de Historia Natural perteneciente a la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se mantuvo congelado a -4°C el veneno hasta su utilización.



FIGURA 6. Serpiente peruana *Bothrops atrox* “Jergón de la selva”

4.1.2. Animales de experimentación

Se emplearon ratones albinos cepa Balb C de sexo masculino con un peso entre 18 y 22g originarios del bioterio del Instituto Nacional de Salud (INS-Perú). La asistencia animal fue hecha de acuerdo con las recomendaciones éticas de la Investigación Biomédica con animales del Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (COIMS).

4.2. Materiales de Laboratorio

4.2.1. Sustrato y reactivos de la actividad enzimática

- Ácido hialurónico comercial de *Streptococcus zooepidemicus* (Sigma Chemical Company)

- Bromuro de cetiltrimetil amonio (BCTA 2.5 % con NaOH 2 %) (Sigma Chemical Co.)
- Enzima L-aminoácido oxidasa (L-AAO) purificada del veneno de *Bothrops atrox*.

4.2.2. Columnas y geles para cromatografía

- Columna de intercambio iónico DEAE Sephadex A-50 (Sigma Chemical Co.)
- Columna de exclusión molecular Sephadex G-100 (Sigma Chemical Co.)
- Columna de exclusión molecular Sephadex G-75 (Sigma Chemical Co.)
- Columna de fase reversa Vydac C18 (Western Analytical)

4.2.3. Reactivos para electroforesis de proteínas e inmunodifusión.

- Acrilamida (Sigma Chemical Co.)
- Bis-acrilamida (Sigma Chemical Co.)
- Dodecil sulfato de sodio (SDS) (Sigma Chemical Co.)
- Tetrametiletilenodiamina (TEMED) (Sigma Chemical Co.)
- Persulfato de amonio (Sigma Chemical Co.)
- Azul de bromofenol (Sigma Chemical Co.)
- Azul brillante de Coomassie R-250 al 0.1 % (Sigma Chemical Co.)
- Solución decolorante: metanol, etanol, ácido acético (Sigma Chemical Co.)
- 2 β Mercaptoetanol al 4% (Sigma Chemical Co.) Buffer fosfato salino (PBS) pH 7.4 (Sigma Chemical Co.)
- Marcador molecular comercial kit Perfect Protein™ Markers (15-225 kDa)

4.2.4. Kits para el aislamiento y purificación de RNA

- RNA Later®
- Kit High Pure RNA isolation (Roche®)

4.2.5. Kits para obtención y amplificación de RNA/cDNA.

- cDNA Synthesis (Roche®)
- Kit First Strand cDNA synthesis (Novagen)
- Kit Hot Start DNA Polymerase (Thermo Scientific).
- Kit Maxima first strand cDNA synthesis for RT-qPCR (Thermo Scientific)
- Kit Reverd aid first strand cDNA synthesis (Thermo Scientific)
- Kit Total RNA Purification (AMRESCO®)
- Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™).

4.2.5. Reactivos empleados para la electroforesis de ácidos nucleicos

- Agarosa tipo I (Calbiochem®) al 1%.
- Colorante RedGel (10000X).
- Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder.
- Orange Ruler 50 bp DNA Ladder.
- Tampón de muestra (Novagen®).
- Tampón TBE X (Tris 892 mM, ácido bórico 889 mM y EDTA 20 mM pH 0.5).

4.2.7. Instrumentos bioinformáticos

- Bioedit 7.0.4 (Página web <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).
- BLASTn y BLASTp (Página web <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).
- BoxShade3.21 (Página web http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) web
- Clustal X 1.8 (Página web <http://www.clustal.org>).
- Cn3D4.1 (Página web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>) web
- Codon Usage (Página web http://www.bioinformatics.org/sms2/codon_usage.html) web
- GenBank (Página web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- Mega 5 (Página web <http://www.megasoftware.net/>).
- NetNGlyc (Página web <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)

- ORF finder (Página web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>).
- PIR (Página web <http://pir.georgetown.edu/pirwww/search/pattern.shtml>)
- PyMOL (Página web <https://www.pymol.org/>)
- Signal P (Página web <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).
- SWISS-MODEL (Página web <http://swissmodel.expasy.org/>)
- Translate Tool (Página web <http://www.expasy.org>).

4.2.8. Soluciones y reactivos que actúan sobre la actividad enzimática

- Ácido etilen diamino tetraacético (EDTA) (Sigma Chemical Co.)
- Ácido Glutámico (M.C & B)
- Glicina (M.C & B)
- Glutación (M.C & B)
- Iodoacetato (Sigma Chemical Co.)
- Bromuro de potasio (M.C & B)
- Cloruro de calcio (Sigma Chemical Co.)
- Cloruro de magnesio (M.C & B)
- Cloruro de potasio (Riedel-de Haën)
- Cloruro de sodio (Carlos Erba)
- Tosyl lisil clorometil cetona (TLCK) (Sigma Chemical Co.)

4.2.9. Tampón (buffer) y Otros

- Tampón acetato de amonio 0.1 M pH 5.0 (Riedel-de Haën)
- Tampón acetato de amonio 0.1 M pH 5.0, NaCl 0.3 M
- Tampón acetato de amonio 0.1 M pH 5.0, NaCl 0.6 M
- Tampón acetato de amonio 0.05 M pH 5.0, NaCl 0.15 M
- Tampón de corrida: Tris 0.1 M, SDS 0.1 %, glicina, pH 8.3
- Tampón de stacking: Tris 1.0 M, pH 6.8 (Sigma Chemical Co.)
- Tampón de resolución: Tris 1.5 M, pH 8.8 (Sigma Chemical Co.)
- Tampón de muestra: Tris 0.06 M, SDS 0.05 %, glicerol 10% v/v, azul de bromofenol 0.05 %
- Tampón acetato de amonio 0.1 M, pH 5, 5.5, 6 y 6.5 (Riedel-de Haën)
- Tampón Tris-HCl 0.1 M, pH 7 y 8 (Sigma Chemical Co.)

- Tampón isotónico: Glicina 0.1 M en NaCl 0.9 %, pH 7.3 (M.C & B)
- Tampón glicina 0.05 M ,pH 8.3 (M.C & B)
- Tampón fosfato: PBS 0.15 M, pH 7 (Sigma Chemical Co.)
- Tampón Tris-HCl CaCl₂ 10 mM, pH 7.4 (Sigma Chemical Co.)
- Solución Alcalina: Carbonato de sodio 4 % (Sigma Chemical Co.), tartrato de sodio y potasio 4% (Riedel-de Haën) y sulfato de cobre 2 % (Merck & Co) en proporción 100:1:1
- Reactivo de Folin –Ciocalteu (1:6) (Sigma Chemical Co.)
- Solución salina compuesta de NaCl 0.9 %, pH 7.3 (Carlos Erba)
- Citrato de sodio 3.8 % (Sigma Chemical Co.)
- Solución fría compuesta por NaCl 0.9 %, pH 7.3, EDTA 1mM (Sigma Chemical Co.)

4.2.10. Material de vidrio y otros

- Probetas graduadas de 500, 250, 100, 50 y 10 mL
- Vasos de precipitado de 500, 250, 100 y 30 mL
- Viales de 10 µL, 100 µL y 1 mL.
- Baguetas
- Embudos
- Pipetas de 10, 5, 2, 1 y 0,2 mL.
- Tubos de 13 x 100 mm
- Columnas cromatográficas de vidrio.
- Tubos para centrifuga con filtro Amicon™ (Thermo Scientific)
- Micro pipetas graduadas de 1, 10, 20 y 200 µL y 1 mL

4.2.11. Equipos

- Balanza Analítica (Ainsworth).
- Baño de temperatura (Mettler).
- Centrifuga (Sorvall Instruments -Modelo Easy Spin).
- Colector automático de fracciones (LKB-Pharmacia).
- Cuantificador de ácidos nucleicos Qubit fluorometer (Invitrogen™).

- Equipo de electroforesis horizontal Wide Mini-Sub Cell GT System (Bio-Rad).
- Equipo de electroforesis vertical en placa (Techware).
- Equipo de HPLC (Hitachi High- Technologies)
- Espectrofotometro de microgota NanoDrop (ThermoFisher Scientific)
- Espectrofotómetro UV 120-02 (Shimadzu).
- Fotocolorímetro Spectronic (Bausch & Lomb).
- Fotodocumentador
- Fuente de poder para electroforesis (Duostat Beckman).
- Liofilizador (Labconco).
- Microcentrífuga (Denver Instrument).
- Potenciómetro digital (Orion Research- serie 611).
- Secuenciador de proteínas (Shimadzu Automatic System PPSQ-21A).
- Termociclador (Eppendorf Mastercycler Personal).
- Transiluminador UVStar 312nm (Biometra).

4.3. METODOLOGÍA

4.3.1. Caracterización Bioquímica

4.3.1.1. Purificación de la Hyal-Ba del veneno de la serpiente *B. atrox*.

Para la separación de esta enzima se realizaron los siguientes pasos cromatográficos:

300 mg de veneno crudo fueron disueltos en tampón acetato de amonio 0.05M a pH 5.0, posteriormente se centrifugó a 4 000 rpm por 15 minutos para eliminar los restos no solubles. Se aplicó el sobrenadante a la columna de intercambio iónico sobre Sephadex DEAE A-50 (1.2 x 40 cm) equilibrada con tampón acetato de amonio 0.05 M a pH 5.0. La corrida tuvo un flujo de 14 mL/hora colectándose fracciones de 1 mL. El monitoreo de la cantidad de proteína se hizo por absorbancia a 280 nm y de la obtención de Hyal-Ba, por el ensayo turbidimétrico de Di-Ferrante (1955). Las fracciones con mayor actividad se juntaron y se concentraron por centrifugación usando tubos AMICON, lo que se concentró fue aplicado en una columna de filtración molecular Sephadex G-100 (1 x 40 cm) previamente equilibrada con tampón acetato de amonio 0.05M, pH 5.0. Con un

flujo de 14 mL/hora se recolectaron fracciones de 1 mL. Las fracciones con mayor actividad se juntaron y se aplicaron nuevamente a una columna de filtración molecular sobre Sephadex G-75 (1 x 30 cm) equilibrada de la misma forma que el paso anterior. Las fracciones de 1 mL fueron colectadas a un flujo de 10 mL/hora. Las fracciones con actividad hialuronidasa fueron guardadas y se evaluó su pureza mediante HPLC en fase reversa empleando una columna Vydac C18 (22 mm x 25 cm). La elución fue realizada a un flujo constante de 1 mL/min mediante una gradiente lineal de 0-70% de acetonitrilo en 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) por un tiempo de 70 min, la corrida fue terminada por elución isocrática con 58% de acetonitrilo en 0.1% de TFA por 5 min. Las absorbancias fueron registradas a $\lambda = 280$ nm.

4.3.1.1.1. Secuenciación aminoacídica

La secuencia de aminoácidos N-Terminal de Hyal-Ba fue determinada en un secuenciador de proteínas Shimadzu Automatic System (PPSQ-21A) por el método de degradación de Edman (Edman and Begg, 1967).

4.3.1.2. Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteína del veneno total de *Bothrops atrox* y de la Hyal-Ba fue evaluado mediante la metodología de la absorción de luz ultravioleta y por el método de Lowry.

4.3.1.2.1 Ensayo de absorción de luz ultravioleta. - se midió la absorbancia en el rango de luz ultravioleta a 280 nm (Warburg y Christian, 1941) y confirmado por el método de absorción 280/205 nm (Scopes, 1974) empleando un espectrofotómetro UV/visible Shimadzu.

4.3.1.2.2. Ensayo de Lowry. - se empleó el ensayo de Lowry *et al.*, 1951, variado por Loayza *et al.*, 1985. Se usó solución alcalina, el reactivo de Folin-Ciocalteu (1:6) y albúmina sérica bovina como proteína estándar. Para los ensayos, se colocaron las muestras con un volumen de 0.5 mL, luego se agregaron 2 mL de solución alcalina incubándolas a 37 °C por 15 minutos. Se agregó después 0.5 mL del reactivo Folin- Ciocalteu y después de 30 minutos a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 660 nm.

4.3.1.3. Evaluación de la actividad hialuronidasa.

La actividad de la enzima se realizó por el ensayo turbidimétrico de Di-Ferrante, (1955) modificado por Hurtado *et. al.*, 2007. El fundamento reside en la formación de una mezcla turbia y relativamente insoluble con el ácido hialurónico y el reactivo Bromuro de Cetiltrimetil Amonio (BCTA), el cual paró la reacción al subir el pH a 12.5, obteniéndose una intensidad en la turbidez con respecto a su proporción y a la concentración del mucopolisacárido.

Para este ensayo se utilizó 0.2 mL de ácido hialurónico a 0.5 mg/mL de concentración diluido en tampón acetato de amonio pH 5.0 a 0.05M más NaCl 0.15 M; 0.25 ml de tampón de reacción y se adicionó 0.05 mL de muestra. Se incubó luego a una temperatura de 37°C por 15 minutos, la reacción se detuvo con 2mL de BCTA al 2.5%, teniéndose un volumen final de 2.5 mL en cada tubo de ensayo. Luego de estar a temperatura ambiente por 5 minutos, la turbidez observada se evaluó a 400 nm.

La enzima posee una actividad específica que es manifestada en unidades Di-Ferrante por mg de proteína. El valor de una unidad Di-Ferrante nos señala la disminución del 50% de la turbidez inicial ocasionada por 0.1 mg del sustrato ácido hialurónico despues de los 15 min. de incubación a 37°C.

4.3.1.4. Determinación de la masa molecular y presencia de carbohidratos

Se realizó mediante SDS-PAGE al 12% según lo descrito por Laemmli (1970). Se utilizó una cámara electroforética vertical bajo condiciones reductoras (4% de 2-β Mercaptoetanol) y no reductoras.

La masa molecular relativa (Mr) fue calculada por comparación con proteínas estándar del kit Perfect Protein™ Markers, 15-225 kDa. La tinción de los geles fue realizada con el colorante azul brillante de Coomassie G-250.

Además, se realizó un zimograma mediante SDS-PAGE (12%) que contenia ácido hialurónico (0.5 mg / ml) en la matriz del gel y se llevó a cabo de acuerdo

con Cevallos *et al.*, (1992). El gel resultante fue teñido con Acian Blue (Sigma Chemical Co.) para detectar la actividad hialuronidasa.

Para evaluar la cantidad de hexosas y hexosaminas unidas a Hyal-Ba, se empleó el ensayo de Winzler (1955), mientras en el caso del ácido siálico se empleó el ensayo de Warren (1959), con algunas modificaciones descritas en Lazo *et al.*, (2017).

4.3.1.5. Determinación de la estabilidad

Para determinar las condiciones óptimas para la actividad enzimática, el sustrato y la Hyal-Ba fueron incubados por 15 minutos a diferentes temperaturas (4 °C- 60 °C) para determinar a que temperaturas puede actuar la enzima.

También se realizó ensayos de la enzima sola a temperatura ambiente en la cual se evaluó la actividad de la enzima mediante el ensayo de Di-Ferrante a partir de las cero hasta las 192 horas.

4.3.1.6. Evaluación del pH óptimo

Se determinó utilizando volúmenes de la enzima que se incubaron a distintos pH. Se utilizó el tampón acetato de amonio 0.1 M (pH 5, 5.5, 6 y 6.5) y tampón Tris-HCl 0.1 M (pH 7 y 8). Estos tampones fueron usados para el registro de la actividad enzimática de acuerdo al ensayo de Di-Ferrante. Después de 15 minutos a temperatura de 37 °C se evaluó la actividad de cada muestra con los distintos valores de pH.

4.3.1.7. Efecto de iones sobre Hyal-Ba

Para estas pruebas, se elaboraron mezclas de reacción que incluyen: KBr, KCl, NaCl, CaCl₂ y MgCl₂ a concentraciones de 0.05, 0.1, 0.15 y 0.3 M. Se pre incubaron alícuotas de la enzima (75 µL) con el respectivo ión (75 µL) por 10 minutos a 37 °C. Posteriormente se tomaron 75 µL de la mezcla y se evaluó la actividad enzimática de acuerdo al ensayo Di-Ferrante (1955).

4.3.2. Ensayos de inhibición de la actividad de Hyal-Ba y reconocimiento del suero antibotrópico.

Para realizar esta prueba se utilizó: TLCK, L-ácido glutámico, EDTA, iodoacetato, L-glicina y el tripéptido glutatión preparados a concentraciones de 3, 6 y 12 mM.

Se tomó 150 µL de Hyal-Ba y 150 µL del agente inhibidor, pre incubándose a 37°C por 10 minutos. Posteriormente se cogió 100 µL de las combinaciones, para realizar las pruebas de actividad enzimática.

El veneno extraído y Hyal-Ba se evaluaron por inmunodifusión (Ouchterlony y Nilsson, 1978) contra el suero antibotrópico polivalente producido por el INS. El ensayo de inmunodifusión se realizó sobre geles de agarosa al 1 % en tampón fosfato 0.15 M pH 7.0. Para lo cual, la agarosa se diluyó en este tampón y se calentó por 5 minutos a 100 °C y 3 mL de esta mezcla se extendió en portaobjetos de vidrio, los cuales se dejaron enfriar por 10 minutos. Posteriormente se realizaron tres pocillos en cada lámina portaobjeto con igual distancia de separación. Se agregó 20 µL de suero antibotrópico en el pocillo del centro, mientras que, en los pocillos laterales, 10 µL de veneno crudo (5 mg/mL) y 10µL de Hyal-Ba (0.1 mg/mL). Para finalizar la inmunodifusión se usó una cámara húmeda a 10 °C por 48 horas en la cual, se lavaron las láminas con citrato trisódico al 5 % por 10 minutos y para terminar se hicieron seis lavados cada 6 horas con Cloruro de sodio al 0.9 %.

Para la tinción se empleó azul brillante de Coomassie por 15 minutos, dejándolas en decolorante por 12 horas hasta que aparecieron las líneas de precipitación. Luego se lavaron con agua destilada por 10 minutos y se revistió la lámina con papel filtro para colocarla en una estufa a 37 °C durante 24 horas. Luego se observó si en la lámina gelificada y secada, se evidencian los arcos de precipitación.

4.3.3. Caracterización Biológica

4.3.3.1. Determinación de la toxicidad

Grupos de 5 ratones de la cepa Balb C procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Salud, fueron inyectados intraperitonealmente con 0.1 mL (5 a 20 µg) de la enzima purificada. Como control positivo se empleó veneno completo de *B. atrox* (20 µg) y como control negativo 0.1 mL de cloruro de sodio 0.9%. Después de 48 horas de observación los ratones tuvieron que ser sacrificados para el análisis de los posibles daños cutáneos o viscerales

4.3.3.2. Acción hemorrágica

Se empleó el ensayo de Kondo *et al.*, (1960) variado por Isla *et al.*, (2003), para lo cual se elaboraron 5 muestras para inocularlas en ratones albinos por vía intradérmica. La muestra 1 contenía una dosis hemorrágica mínima (1 DHM) del veneno de *B. atrox* equivalente a 1.4 µg de veneno, según lo dispuesto por Segura *et al.*, (2010). Una DHM se explica como la dosis de veneno (µg) que produce 10 mm de diámetro hemorrágico. La muestra 2 contenía 1.4 µg de veneno completo previamente inactivado por calor a 60 °C, la muestra 3 contenía 1.4 µg de la Hyal-Ba, la muestra 4 tenía la combinación de 1.4 µg de veneno y de la enzima (0.5 mg/mL) respectivamente; finalmente, la muestra 5 contenía veneno inactivado por calor mezclado con Hyal-Ba (1.4 µg c/u). Después de dos horas, los ratones se sacrificaron y se les retiró la piel del área abdominal para luego calcular el diámetro y área hemorrágica formada en su respectivo lado interno.

4.3.3.3. Edema en pata

Fue realizado de acuerdo al protocolo planteado por Bordon *et al.*, (2012). El edema en pata fue inducido en ratones albinos cepa Balb C (20-22gr) por la inyección del cojinete de la pata derecha subplantar de buffer conteniendo LAAO (15 µg) con y sin Hyal-Ba (1.2 µg) en la pata trasera derecha. Como control negativo se empleó solución salina. El seguimiento de la actividad edemática fue realizada según Lazo *et al.*, (2017).

4.3.4. Estudios cinéticos

Los estudios cinéticos fueron realizados de acuerdo a Poh *et al.*, (1992). Hyal-Ba (0.9 µg/µL) fue incubada 15 min en las condiciones óptimas anteriormente determinadas con ácido hialurónico (0-100 µg/mL). La velocidad de reacción fue expresada como microgramos de sustrato hidrolizado por mililitro por minuto; K_m y V_{max} fueron determinados con Prisma 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). La especificidad de la Hyal-Ba purificada fue determinada empleando varios sustratos nativos (condrotín sulfato A, B y C y heparina, 5-50 µg/mL cada uno)..

4.3.5. Caracterización Molecular

4.3.5.1. Extracción del veneno

Se tomaron muestras de veneno fresco de ejemplares de serpientes de la especie *Bothrops atrox* mantenidas en cautiverio en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Dichas serpientes son alimentadas periódicamente con ratones de la cepa Balb C criados en el bioterio del INS-Lima; un mes después de su última alimentación las serpientes fueron ordeñadas.

El veneno se extrajo por presión manual de las glándulas venenosas y se colectó en un criovial de 1.5 mL por colmillo de la serpiente. El volumen obtenido de veneno por colmillo fue de 400 µL.

4.3.5.2. Estabilización de RNA total.

Una vez hecha la colecta del veneno por presión manual, se adicionaron 800 µL de la solución de RNA later® a 400µL de veneno fresco con el fin de mantener integro la calidad del RNA total.

El volumen total (1200 µL por cada criovial colectado) fue transportado luego desde el sitio de colecta (Museo de Historia Natural) hasta el laboratorio de Biología Molecular-UNMSM para su procesamiento.

4.3.5.3. Aislamiento de RNA total.

Antes de la extracción de RNA, la muestra con veneno con la solución de RNA Later® se homogenizó y se centrifugó a 1.000 g x 1 minuto. Luego el sobrenadante fue retirado y el pellet precipitado fue utilizado ya que es allí donde se encuentran las células de donde queremos extraer RNA. Luego se empleó el kit de aislamiento High Pure de Roche® y se siguió con el siguiente protocolo:

- El pellet se resuspendió en 200 µL de PBS.
- Se agregó luego 400 µL de solución de Lisis-Ligación para luego pasarlo por el vortex durante 15 segundos hasta que quede traslúcida.
- Para transferir la muestra a un tubo de filtro High Pure se insertó un tubo de filtro de High Pure en un tubo de recolección. Se tiene que pipetear toda la muestra en el depósito superior del tubo de filtro (máx. 700 µL).
- Se inserta en conjunto tubo de filtro High Pure completo en una centrífuga. Se centrifugó por 8,000 g x 15 segundos.
- Después de centrifugar se retira el tubo del filtro del tubo de recolección; se desecha el sobrenadante y se vuelve a combinar el tubo de filtro y el tubo de recolección usado.
- Después de reinsertar el tubo del filtro para cada muestra, se agregó 90 µL de tampón de incubación de DNasa I en un tubo de reacción estéril, se agregó 10 µL de DNasa I, se mezcló y pipeteó la solución en el vellón de fibra de vidrio en el depósito superior del tubo filtro. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se agregó 500 µL de tampón de lavado I al conjunto del tubo de filtro y se centrifugó a 8,000 g x 15 segundos. Luego se desechó el filtrado y denuevo se ensambla el tubo de filtro con el tubo de recolección usado.
- Se agregó 500 µL de tampón de lavado II al conjunto del tubo de filtro y se centrifugó a 8,000 g x 15 segundos. Luego se desechó el filtrado y denuevo se ensambla el tubo de filtro con el tubo de recolección usado.
- Se repite el paso anterior, pero agregando 200 µL de tampón de lavado II y centrifugando por 2 minutos a la velocidad máxima (aproximadamente 13,000 g) para eliminar cualquier tampón de lavado residual.
- Se desechó el tubo de recolección y se insertó el tubo de filtro en un tubo de microcentrífuga limpio y estéril de 1,5 mL.

- Para eluir el RNA se agregó 50 μL de tampón de elución al tubo de filtro. Se centrifugó durante 1 minuto a 8,000 g.
- El tubo de microcentrífuga contiene el RNA eluido y purificado, que en nuestro caso lo utilizaremos para obtener cDNA.

4.3.5.4. Cuantificación

Para la cuantificación del RNA total y del cDNA obtenido se utilizó el Fluorómetro Qubit® 2.0 y el espectrómetro NanoDrop respectivamente, los cuales nos permitieron cuantificar en pequeños volúmenes los ácidos nucleicos obtenidos en cada paso.

4.3.5.5. Obtención del cDNA

Una vez obtenido el RNA total se procedió a realizar la conversión a cDNA con el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (NOVAGEN) empleando el procedimiento descrito por Vivas-Ruiz et al., 2013.

En un tubo para PCR estéril libre de nucleasas, se preparó la mezcla de primer-templado para una reacción de 25 μL , adicionando los componentes según los pasos del protocolo detallados a continuación:

- Se preparó el siguiente tubo de reacción:

TABLA 2. Preparación del tubo de reacción para la obtención del Mix primer-templado.

Mix Primer-Templado		
Componente	Volumen	Concentración final
Agua, libre de nucleasas	4 μL	
Primer oligo(dT)	0.5 μL	0.5 μg
RNA total	8 μL	50 μg de RNA total.
Volumen total	12.5 μL	

- Se desnaturizó la mezcla Primer /templado del tubo calentado por 10 minutos a 70°C en un termociclador. Fue enfriado inmediatamente colocando el tubo en hielo.
- Se adicionaron los componentes faltantes del mix de reacción como indica el siguiente cuadro, mezclar (no pasar por el vortex).

TABLA 3. Preparación del tubo de reacción para la obtención final de cDNA.

Síntesis de cDNA		
Componente	Volumen	Concentración final
Buffer de reacción 5X	4 µL	250 mM ; 15 mM MgCl ₂
Mix de dNTP (10mM de cada uno)	2 µL	1mM de cada uno.
DTT (100 mM)	2 µL	
Transcriptasa reversa MMLV	0,5 µL	10U
Volumen total	20 µL	

- Se mezclaron suavemente con cuidado e inmediatamente se incubaron a 37 °C por 60 minutos
- Luego se usó lo obtenido de la reacción para su amplificación por PCR inmediatamente o mantenerlo a -20°C.

4.3.5.6. Diseño de Primers

Las hialuronidasas que han sido secuenciadas hasta el momento y colocadas en el GenBank para los venenos ofídicos de las familias de los Elapidos y Viperidos por lo general son incompletas.

La bibliografía precedente a esta investigación determina que el cDNA de las hialuronidasas oscila entre los 1500 y 2500 pares de bases (pb). Luego de un análisis minucioso de los reportes científicos y de los datos que se encuentran en el GenBank, se estableció la estrategia de diseño de primers que abarcaran las longitudes totales de las hialuronidasas de *Protobothrops mucrosquamatus* (GenBank: XM_015822281.1), *Ovophis okinavensis* (GenBank: AB851978.1), *Protobothrops flavoviridis* (Gen Bank: AB851937.1) y *Bothrops neuwiedi pauloensis* (GenBank: FJ654998.1) ya que se procedió a hacer el alineamiento múltiple completo, retirando gaps por conveniencia y alineandolos.

Las secuencias nucleotídicas alineadas se obtuvo usando el programa Bioedit 7.0.4 (Hall, 1999) usando Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) y su edición en formato FASTA se desarrolló por el programa Box Shade 3.21 (K. Hoffmann y M. Baron, <http://www.ch.embnet.org/software/BOXform.html>).

Se continuó luego con la elaboración de primers de la manera manual el cual debe contar con las siguientes consideraciones para su elaboración: que el tamaño del Iniciador debe ser de 22 pb y que el contenido de G y C se encuentre entre 50 % a menos.

Adicionalmente, y considerando el tamaño de la secuencia a amplificar, se optó por usar 5 pares de primers. La síntesis de estos primers fue encomendada a la casa Invitrogen Custom Primers.

Se listan a continuación los primers obtenidos manualmente de 22 pb.

TABLA 4. Secuencia de los Primers diseñados de 22 pb (forward y reverse)

PRIMERS	SECUENCIA
HD1 (Forward)	5' CTCCCGCGGATGTTACTCGTGG 3'
HD2 (Forward)	5' ATTTGGAAGGTCGTTCTTCTCA 3'
HD3 (Forward)	5' ATAAATCAAATCGGATATTGA 3'
HDr4 (Reverse)	5' CCAGTTTTCCAGTCAATGACT 3'
HD5 (Forward)	5' TGAAACCATATTGAGGTCAAGT 3'
HD6 (Forward)	5' ATTGGGACGTTATATCGTTAAT 3'
HDr7 (Reverse)	5' CACATCTTCCACGTTTCTTGCA 3'
HDr8 (Reverse)	5' CCAGTTTTCTTTTACAATCAC 3'
HD9 (Forward)	5' AATTCCATTAGGTCTTCTGAAG 3'
HDr10 (Reverse)	5' TTCCTTAATTTTAAATTACAGC 3'

También fueron utilizados los primers que se empleó para la hialuronidasa de *Bothrops pauloensis* (HyaseF: 5' TTGGTGAAACAGCGGCCATG 3' y HyaseR: 5' CTTTTCATCCAGCACAATAC 3' de 20 pb para cada forward y reverse).

Luego de evaluar los primers obtenidos, se diseñaron dos primers externos el forward HD0: 5' ACCTCGTCGTCTCTGCGTGGCCTACA 3' (26 pb) y el reverse HD11: 5' CCACACAATACTTTAATATTTGGG 3' (24 pb).

4.3.5.7. Amplificación de los segmentos de las secuencias de la enzima hialuronidasa de *Bothrops atrox*.

La secuencia consenso que queremos amplificar se dividió en 8 segmentos, para obtener estos segmentos se realizaron combinaciones de los distintos primers forward y reverse.

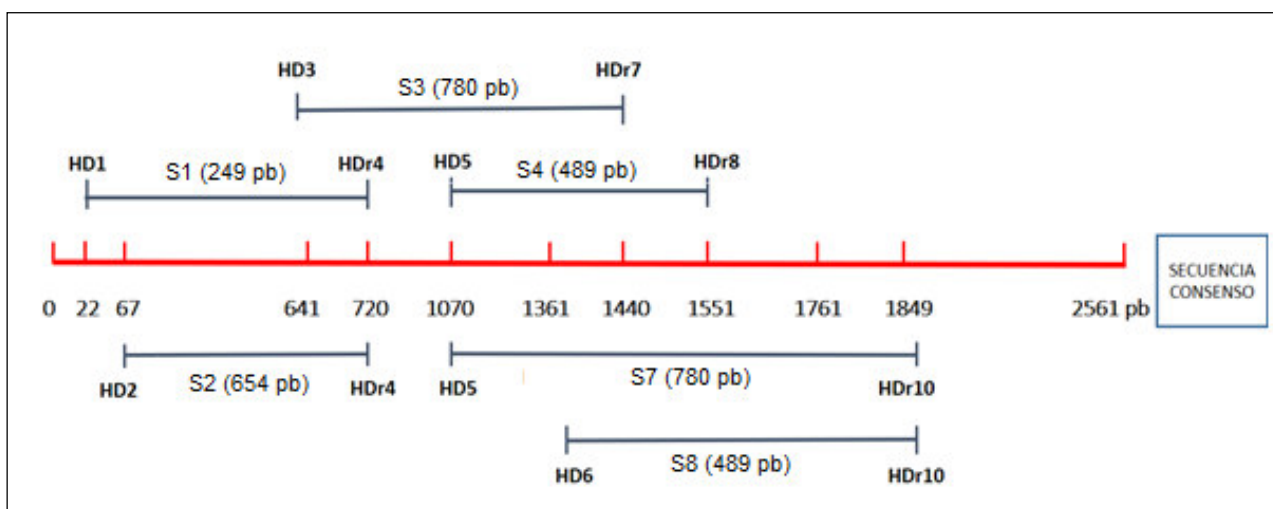


FIGURA 7. Segmentos de la secuencia consenso para la obtención de la Hyal-Ba.

TABLA 5. Tamaño de los segmentos de las secuencias consenso para la obtención de la Hyal-Ba

Segmento	Primers	Tamaño
SEGMENTO 1	HD1-HDr4	(22-720 pb)
SEGMENTO 2	HD2-HDr4	(67-720 pb)
SEGMENTO 3	HD3-HDr7	(641-1440 pb)
SEGMENTO 4	HD5-HDr8	(1070-1551 pb)
SEGMENTO 5:	HD5-HDr7	(1070-1440 pb)
SEGMENTO 6	HD6- HDr8	(1361-1551 pb)
SEGMENTO 7	HD5-HDr10	(1070-1849 pb)
SEGMENTO 8	HD6- HDr10	(1361-1849 pb)

La amplificación de los segmentos del gen de la Hyal-Ba se realizó mediante el uso del kit Hot Start DNA Polymerase (Thermo Scientific). Se emplearon 2 protocolos de PCR para los segmentos de la secuencia de interés. (Estos protocolos emplearon como temperatura de hibridación a aquellas secuencias que estén cerca de los 60°C).

TABLA 6. Preparación del mix de reacción

Componentes	Volumen
H ₂ O Ultrapura	12.8µL
Buffer de reacción 10X	2.5µL
MgCl ₂ 25mM	2.0µL
dNTPs	2.25µL
Forward	1.0µL
Reverse	1.0µL
Taq Polimerasa	0.2µL
Templado	5.0µL
	Volumen total = 25µL

El primer protocolo se utilizó para los segmentos 2, 3 y 5 con sus respectivos primers. Para los otros segmentos (segmentos 4, 6, 7 y 8) se utilizó una variante del protocolo anterior. Los valores de la reacción del mix se mantuvieron, la única variante fue las condiciones de PCR que se empleó como la temperatura de hibridación (Para el primer protocolo 60 °C y para el segundo 56°C).

El programa de amplificación para ambos protocolos fue dado por un ciclo de desnaturalización inicial 95°C por 5 min; continuado por 32 ciclos de desnaturalización de 30 segundos a 94°C; luego una hibridación por 30 segundos a 60°C para el primer protocolo y a 56°C para el segundo protocolo y polimerización a 72°C por 80 segundos; finalmente, se incubó a 72°C por 7 minutos.

4.3.5.8. Electroforesis en geles de agarosa para ácidos nucleicos

Para la separación de los productos de PCR resultantes se realizó la electroforesis en geles de agarosa al 1%. Se utilizaron los siguientes reactivos y amortiguadores: Agarosa tipo I al 1% disuelta en agua destilada, Tampón TBE 1X que contiene Tris 892 mM, ácido bórico 889 mM y EDTA 20 mM a pH 0.5, también tiene el tampón muestra (Novagen®). Como estándares de peso molecular se utilizaron marcadores en el rango de 50 a 2000 pares de base de DNA (Novagen). Para observar la separación de los productos de PCR resultantes por electroforesis en geles de agarosa al 1% se corrió a un voltaje constante de 80 Voltios. Finalmente, para la visualización de los amplicones se utilizó Gel Red Biotium y visualizados en el Fotodocumentador.

4.3.5.9. Secuencia y análisis de Hyal-Ba

La secuencia de los productos amplificados se obtuvo por petición a la casa comercial MacroGen, Inc (Korea del Sur) por medio de la utilización de un secuenciador automatizado modelo ABI 3730 XL con capacidad límite de 12 Mb/día. Para este fin se emplearon adicionalmente los cebadores internos diseñados HD5: 5' TGAAACCATATTGAGGTCAAGT 3' y HD7: 5' CACATCTTCCACGTTTCTTGCA 3'. Recibida la secuencia nucleotídica, esta fue sometida al análisis de identificación empleando el servidor en línea BLASTn.

La evaluación del análisis de los ORF y de la traducción de la secuencia nucleotídica fue realizado por el programa ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) y el programa Translate Tool (<http://ca.expasy.org>). Para el análisis de los codones de prioridad (Codon Usage) se empleó el programa en línea SMS (http://www.bioinformatics.org/sms2/codon_usage.html).

Para el estudio tanto en identidad como en semejanza de la proteína deducida con respecto a otras hialuronidasas con secuencias completas o truncadas se realizó con el programa en línea BLASTp. Todos estos alineamientos fueron realizados con los programas Clustal X 1.8 y Box Shade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Mediante el programa Protparam (<http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>) se predijó las propiedades bioquímicas de la proteína deducida, la evaluación del péptido señal se dio por el programa Signal P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Con los programas BLASTp y PIR (<http://pir.georgetown.edu/pirwww/search/pattern.shtml>) se analizaron los dominios presentes. Los sitios con mayor probabilidad de glicosilación se predijeron por el programa en línea NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). La estructura secundaria fue determinada por el programa PHD (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html). El análisis a nivel filogenético fue hecho con el programa MEGA 5.

4.3.5.10. Alineación múltiple y su análisis a nivel filogenético

Las secuencias aminoacídicas se alinearon usando el programa de alineamiento de secuencias múltiples CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997) y se volvieron a recrear usando BOXSHADE 3.21. Las secuencias para Hyals se descargaron de Cazy, Pfam, Expasy, Uniprot y NCBI. El análisis a nivel filogenético fue ejecutado por el programa MEGA 5 pero también para un mejor análisis estadístico y filogenético se realizó en R utilizando el paquete Pvclust (Suzuki y Shimodaira, 1996) Los identificadores para estas proteínas se pueden encontrar con los códigos EC / 3.2.1.35, PF01630, GH56 e IPR001329.

4.3.5.11. Análisis Bioinformático de la proteína deducida

4.3.5.11.1. Modelamiento estructural

La predicción de la estructura terciaria de la enzima fue realizada por criterio *Ab initio* y por homología a través de las técnicas de reconocimiento por plegamiento. Mediante el servidor en línea SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) se realizó la búsqueda de hialuronidasas con estructura cristalizada con mayor homología a Hyal-Ba; solo tres estructuras fueron encontradas candidatas como molde (templado) para el modelamiento: *Apis mellífera* (1FCU), *Vespula vulgaris* (2TAM) y *Homo sapiens sapiens* (2PE4). El software MODELLER v 9.16 (Sali y Blundell, 1993) fue empleado para generar el modelo estructural de la enzima en formato .pdb. El mejor modelo se seleccionó a partir de las puntuaciones de la energía proteica optimizada mínima discreta (DOPE) y de la función del objetivo modelador (MOF). La estructura fue refinada usando el servidor 3Drefine (<http://sysbio.rnet.missouri.edu/3Drefine/>). La desviación RMS se calculó utilizando el programa VMD v 1.9.2 (Humphrey et al., 1996). El análisis de validaciones se realizó utilizando SAVES Sever (<https://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>), que incluye PROCHECK WHAT_CHECK, ERRAT, VERIFY_3D y el análisis de los cálculos de los contornos de mapa de Ramachandran para determinar la calidad del modelo generado e identificar a los residuos ubicados en posiciones no favorables. La visualización de la estructura fue generada por el programa Pymol (Delano, 2002).

4.3.5.10.2. Análisis estadístico

Los datos de la actividad de la hialuronidasa fueron referidos como promedio \pm desviación estándar (DS). La evaluación estadística de sus diferencias se realizó usando ANOVA y la prueba de t- Student. Los valores p menor que 0,05 ($p < 0.05$) fueron tomados como significantes.

5. RESULTADOS

5.1. Purificación de la Hyal-Ba y secuenciación aminoacídica.

Se logró purificar de la Hyal-Ba del veneno de *B. atrox* (Fig. 8). En el fraccionamiento inicial en Sephadex DEAE-50 del veneno crudo (300 mg) se obtuvieron 4 picos en condiciones isocráticas (P1-P4) y dos picos restantes al establecer la gradiente lineal con NaCl de 0 hasta 1.0 M (P5 y P6) (Fig. 8A). La actividad enzimática se encontró en el P1 y sus fracciones fueron concentradas (13 mg) y suministradas a la columna de exclusión molecular sobre Sephadex G-100. En este segundo paso (Fig. 8B) se obtuvieron 3 picos (P1I-III), la actividad enzimática fue detectada entre P1-I y P1-II y las fracciones correspondientes fueron concentradas (3.2 mg) y agregadas a la columna de exclusión sobre Sephadex G-75. Este tercer paso (Fig. 8C) permitió la purificación final de Hyal-Ba (2.58 mg) con un 30 % de rendimiento final , 36 veces purificado y una recuperación de proteína del 0.86% (Tabla 7). La homogeneidad de Hyal-Ba fue verificada por RP-HPLC (Fig. 8D) y por PAGE-SDS (Fig. 11). Los primeros 21 aminoácidos en N-terminal fueron determinados a ser: MQAKAPMYPNEPFLVFWNAPT. El contenido de hexosas y hexosaminas fue de 16.38% y 2.7 % respectivamente y la cantidad de ácido síalico fue de 0.69%.

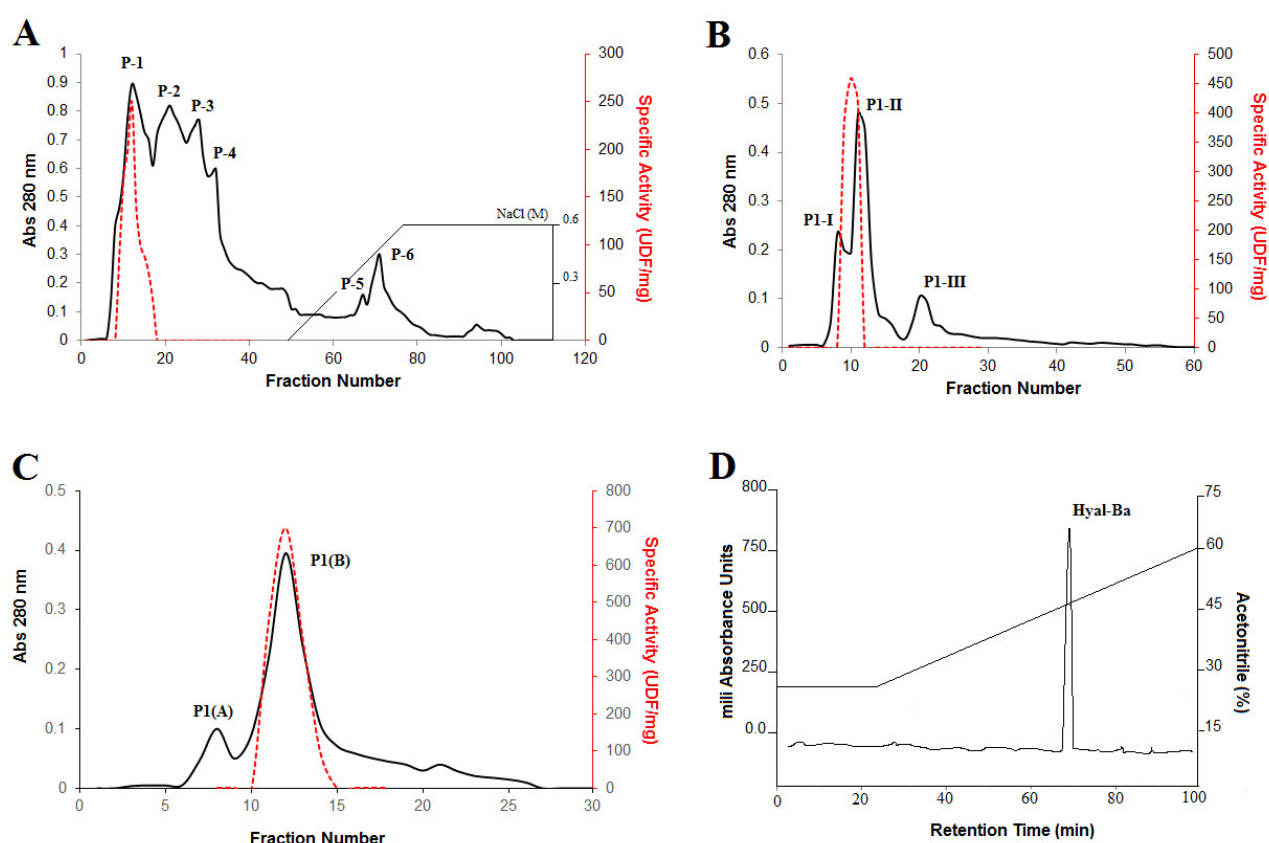


FIGURA 8. Perfil de purificación de Hyal-Ba del veneno de la serpiente *Bothrops atrox*. Las líneas negras representan la cantidad de proteínas medidas a 280 nm. La actividad específica esta con líneas punteadas y esta representada en unidades Di Ferrante. A) Cromatografía de Intercambio iónico del veneno crudo empleando una columna DEAE A-50 (1.2 x 40 cm). La columna fue equilibrada con buffer acetato de amonio 0.05 M (pH 5.0) y eluida con una gradiente lineal de NaCl (0-1.0 M) a un flujo de 14 mL/h. B) Cromatografía de filtración molecular de la fracción P1 en la columna de Sephadex G-100 equilibrada y eluida con el tampón amonio acetato 0.05M a pH 5.0 se mantuvo un flujo constante de 14 mL/h recolectado fracciones de 1mL. C) Cromatografía de filtración molecular de las fracciones comprendidas entre P1-I y P1-II en una columna de Sephadex G-75 equilibrada de la misma forma que en el paso anterior. La elución fue realizada a 10 mL/h y se recolectaron fracciones de 1 mL. D) Evaluación de la pureza de Hyal-Ba por HPLC. La Cromatografía liquida de alta eficacia (HPLC) de fase reversa fue realizada en una columna Vydac C18 (con dimensiones de 822 mm x 25 cm), equilibrada con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1 % . Se estableció una gradiente líneal de Acetonitrilo (0-60%).

TABLA 7. Cuadro de purificación de Hyal-Ba de *B. atrox*.

ETAPAS	Proteína Total Inicial (mg)	Proteína Recuperada (%)	Unidades totales de Actividad (UTA)	Actividad Específica (UDF/mg)	Purificación	Rendimiento (% actividad inicial)
Veneno crudo	300	100	3600	12	1	100
DEAE A-50	13.08	4.3	2070	158.3	13	57.5
Sephadex G-100	3.219	1.1	1352	420	35	37.5
Sephadex G-75	2.58	0.86	11129	437.5	36	29.55

5.2. Estabilidad de la enzima

La Figura 9 nos indica que a temperaturas menores de 25 °C y mayores de 45 °C reducen significativamente la actividad enzimática de la Hyal-Ba, en tanto a temperatura ambiente la enzima mantuvo una actividad notable durante 48 horas teniendo un 41 % de actividad restante, mientras que a las 144 horas la actividad enzimática es cero (Figura 10). La hialuronidasa se inactiva de forma rápida, al ser expuesta a temperatura ambiente (20°-22°C) es algo común por lo general en los venenos ofídicos por lo que, se sigue investigando cuáles serían las óptimas condiciones para que siga activada por un periodo más largo de tiempo, tomando en cuenta que la mayoría de enzimas de serpientes venenosas son muy estables al ser expuestas a temperatura ambiente por varias semanas.

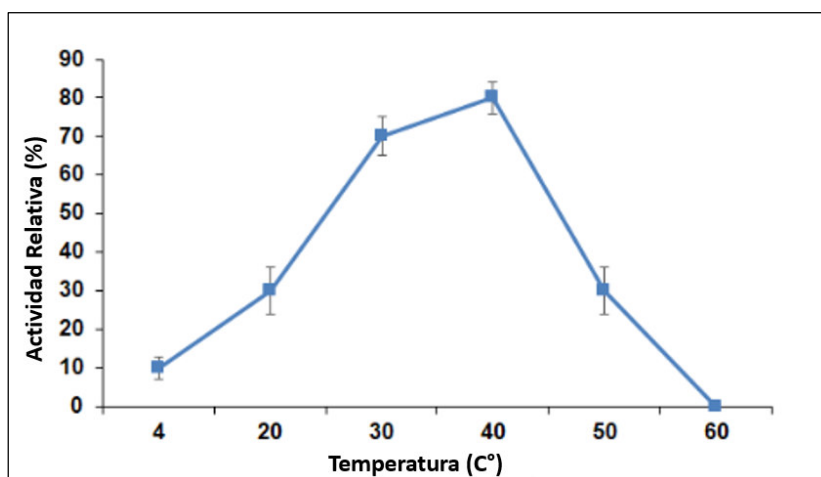


FIGURA 9. Efecto de la temperatura sobre la Hyal-Ba de *B. atrox*.

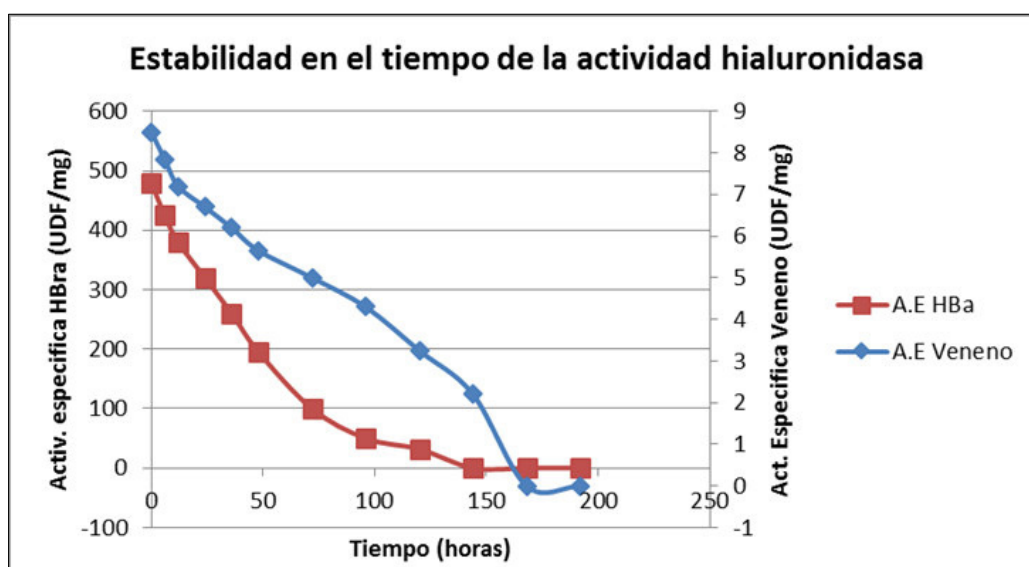


FIGURA 10. Estabilidad de actividad Hyal-Ba de *B. atrox*.

5.3. Pureza, peso molecular y pH óptimo de la enzima.

5.3.1. Peso Molecular

La hialuronidasa del veneno de *B. atrox* fue evaluada por SDS-PAGE al 12% en condiciones reductoras y no reductoras observándose una banda proteica principal de peso molecular de 69 kDa y fue denominada Hyal-Ba. (Figura 11A)

y este peso se comprueba mediante la zimografía con ácido hialurónico que presenta una banda traslúcida del gel coloreado con azul de Acian (Figura 11B).

5.3.2. pH óptimo

En cuanto al pH óptimo encontrado en Hyal-Ba de *B. atrox* se observó un valor de mayor actividad a pH 6.0, ya que se trabajó también con los pH 5.0, 5.5 y 6.5 mientras que con los pH de 7.0 y 8.0 la actividad se reduce notablemente (Figura 12). Esto coincide con otros resultados previos sobre la notoria inestabilidad de esta enzima cuando esta a un pH neutro y levemente alcalino contrario a la mayoría de componentes tóxicos del veneno que por lo general son estables en estos valores.

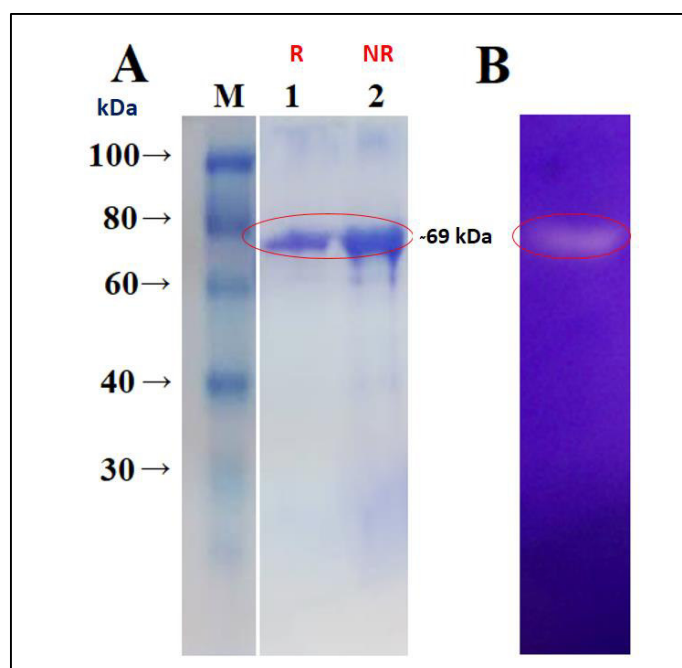


FIGURA 11. Análisis de homogeneidad de Hyal-Ba. A) perfil de SDS PAGE (12%) teñido con azul de Coomassie. M: marcadores moleculares, línea 1: en condiciones reductoras (R) y 2: condiciones no reductoras (NR). B) Análisis de zimografía en gel que contiene ácido hialurónico (0.5 mg / mL) y teñido con azul de Acian.

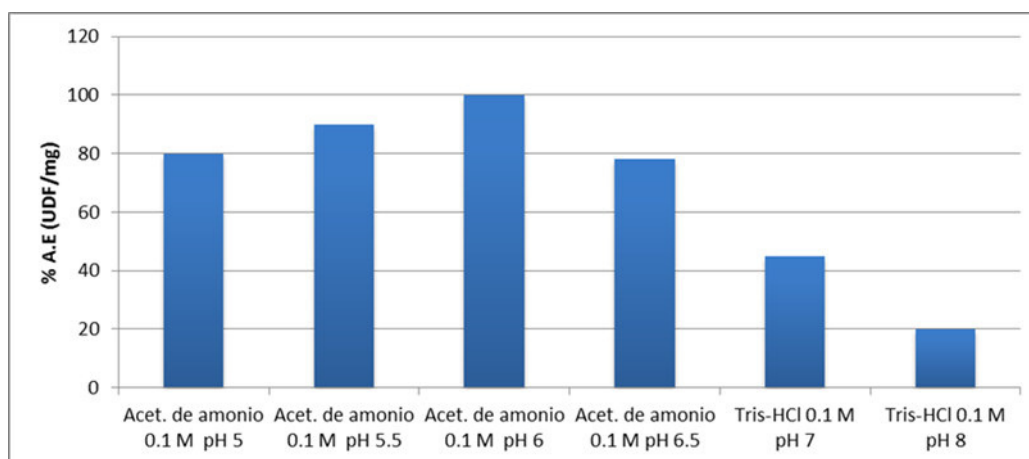


FIGURA 12. pH óptimo de la hialuronidasa de *B. atrox*.

5.4. Efecto de algunos iones sobre Hyal-Ba.

Las pruebas con los iones Na^+ , K^+ , Br^- , Cl^- , Ca^{2+} y Mg^{2+} señalaron un grado distinto de inhibición o activación según la concentración utilizada.

Luego de preincubar la enzima con los iones a concentraciones finales (50 - 300 mM) se obtuvieron los siguientes resultados; en el caso el ion Mg^{+2} provocó la mayor activación inicial de la enzima llegando a un 140% a la concentración de 150 mM mientras tanto, el Ca^{+2} (150 mM) y el K^+ (300 mM) solo manifestaron un leve aumento de la actividad con valores del 107% y 110% respectivamente (ver Tabla 8).

Varios reportes revelan la acción de los cationes divalentes en la actividad de varias enzimas ofídicas. Otros estudios han revelado, que algunos aniones monovalentes como el Cl^- y Br^- incrementan la actividad de la enzima hialuronidasa como sucedió con el veneno de *L. muta* y que los cationes Na^+ y K^+ . para este caso no aumentaron su actividad. En nuestro estudio se comprobó que el ion Mg^{+2} un activador común enzimático en las ponzoñas ofídicas posee acción sobre Hyal-Ba de *B. atrox*.

TABLA 8. Acción de iones sobre la actividad enzimática.

Agentes	% Actividad enzimática (UDF/mg)			
	50 mM	100 mM	150 mM	300 mM
MgCl₂	90	115	140	105
KBr	80	90	95	110
CaCl₂	70	88	107	86
NaCl	78	94	99	84
KCl	65	83	93	78

* UDF = Unidades Di-Ferrante

5.5. Acción de agentes inhibidores

Se trabajó con los inhibidores enzimáticos a concentraciones de 3, 6 y 12 mM, el EDTA produjo el mayor efecto inhibitorio obteniéndose casi una inhibición total de la enzima en estudio con 12 mM. Así mismo se mostró una notable inhibición con TLCK a 6 mM y 12 mM que llegó a porcentajes de 62 y 88 % de inhibición. El iodoacetato a 12 mM tuvo un valor inhibitorio de 39 %, mientras la glicina a 3 mM y 6 mM mostro un valor de 44 y 39 % de inhibición de la actividad respectivamente. En cambio, el ácido glutámico así como también el tripéptido glutatión; no mostraron ningún grado de variación al preincubarse a las tres concentraciones ya que tuvieron una pobre inhibición (menores del 20%) (Ver Tabla 9).

TABLA 9. Acción de los agentes inhibidores sobre la actividad de la hialuronidasa

Concentraciones	% de Inhibición de la Actividad Enzimática					
	Agentes inhibitorios					
	Glicina	Glutation	Ac. Glutámico	Iodoacetato	EDTA	TLCK
3 mM	33	19.5	9	17.2	10	34
6 mM	39	18.5	17	26.2	47	62
12 mM	44	17.7	19	39	97	88

5.6. Toxicidad

Con relación a los ensayos de toxicidad mediante la inoculación de la enzima Hyal-Ba por vía intraperitoneal sobre ratones albinos no se manifestó ningún efecto ni sintoma de toxicidad durante 48 horas. Con este ensayo demostramos que esta enzima no posee toxicidad, lo cual también ha sido reportado en estudios de hialuronidasas de otros ofidios (Ver figura 13).

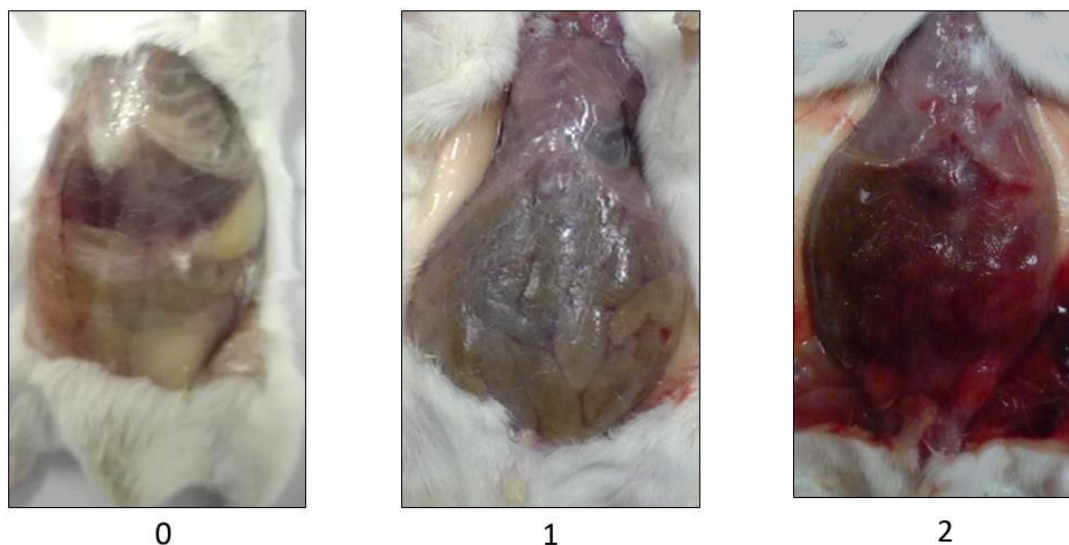


FIGURA 13. Prueba de toxicidad (0) Blanco, (1) Enzima y (2) Veneno crudo. Las pruebas cuantitativas se realizaron por triplicado y se muestra la media + S.D. ** $p < 0.001$ y * $p < 0.01$ en comparación con el control.

5.7. Actividad difusora *in vivo* de la Hyal-Ba sobre la actividad hemorrágica

Para comprobar la acción difusora de la enzima hialuronidasa se usó como parámetro la actividad hemorrágica que posee el veneno de *B. atrox*. De acuerdo con ello: 1.4 μg de veneno equivale a 1 DHM que produce un diámetro hemorrágico de 10 mm y en nuestra prueba el veneno crudo produjo un diámetro hemorrágico de 9.7 ± 0.5 mm. Cuando el veneno fue calentado a 60°C el diámetro hemorrágico se redujo notablemente 3 ± 0.3 mm, sin embargo la enzima purificada no produjo ninguna área hemorrágica. Para el caso del veneno más la enzima purificada el diámetro hemorrágico fue de 12 ± 0.5 mm y al usarse veneno calentado más enzima el valor obtenido fue de 5 ± 0.4 mm) (Figura 14).

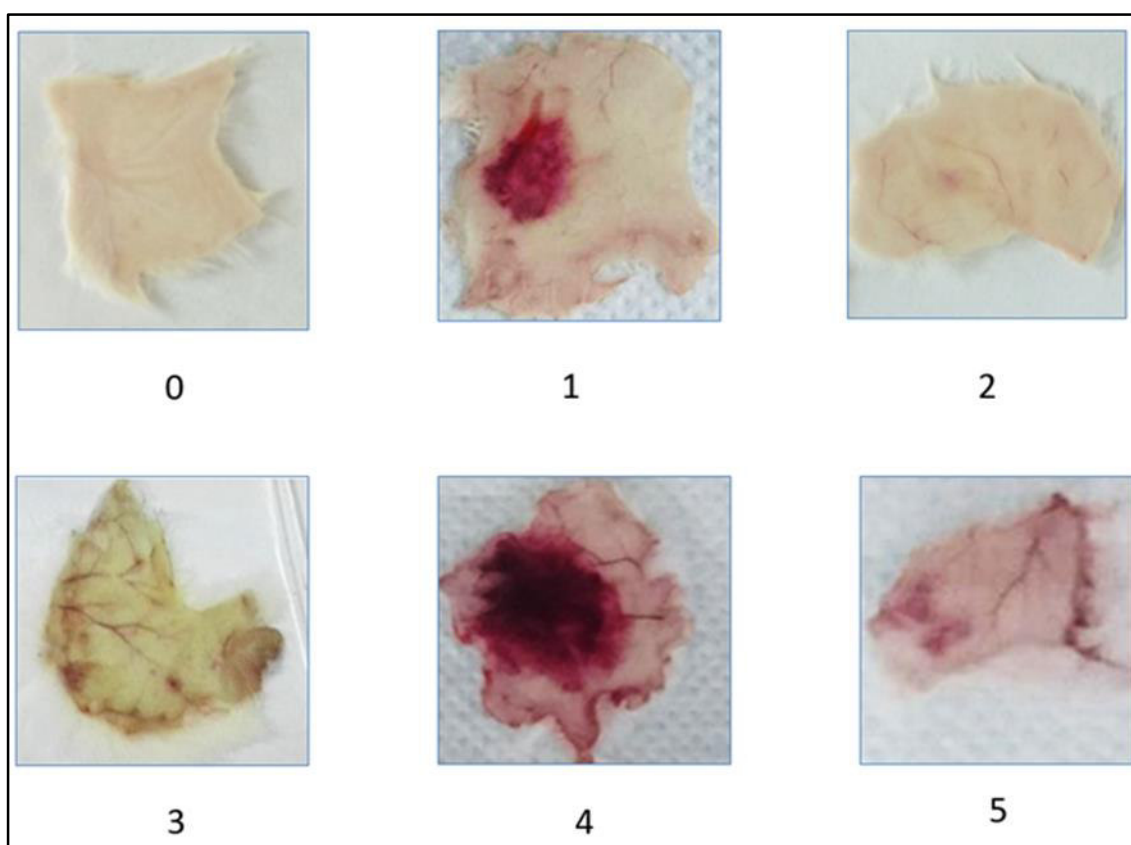


FIGURA 14. Actividad hemorrágica. (0) Blanco, (1) Veneno, (2) Hyal-Ba, (3) Veneno calentado, (4) Veneno más Hyal-Ba y (5) Veneno calentado más Hyal-Ba. Las pruebas cuantitativas se realizaron por triplicado y se muestra la media \pm S.D. ** $p < 0.001$ y * $p < 0.01$ en comparación con el control.

5.8. Actividad edemática

El máximo nivel de edema (Fig. 15) fue observado a los 50 min cuando los ratones fueron inyectados con la LAAO de *B. atrox*, este edema fue significativo comparado con el control ($p < 0.005$), no obstante, Hyal-Ba mostró bajar la actividad edemática al disminuir significativamente ($p < 0.005$) el edema cuando fue agregada junto con la enzima LAAO. A los 300 min el edema disminuyó considerablemente en ambos tratamientos (LAAO sola y LAAO + Hyal-Ba) pero se mantuvieron significativamente altos comparado con el control (Fig. 15).

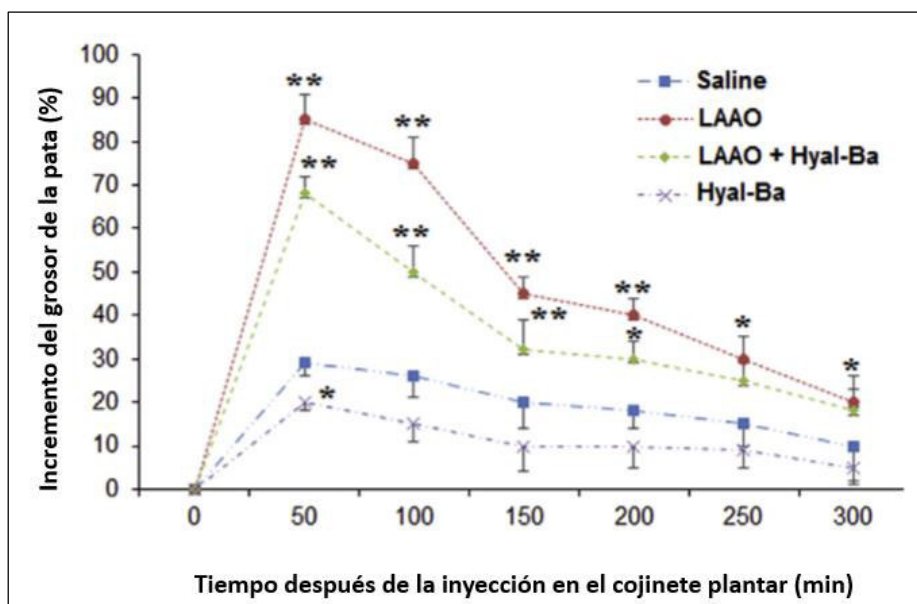


FIGURA 15. Actividad edemática, la Hyal-Ba (1.2 µg) reduce el edema de la pata producido por LAAO (15 µg) y por solución salina (control).

5.9. Antigenicidad

La prueba de inmunodifusión permitió establecer la antigenicidad de la enzima cuya reactividad se evidencia frente al antiveneno botrópico polivalente ya que se forma una línea de precipitación muy marcada. En cambio, el veneno de *B. atrox* enfrentado a este mismo antiveneno, produjo al menos 5 líneas de precipitación (Figura 16).

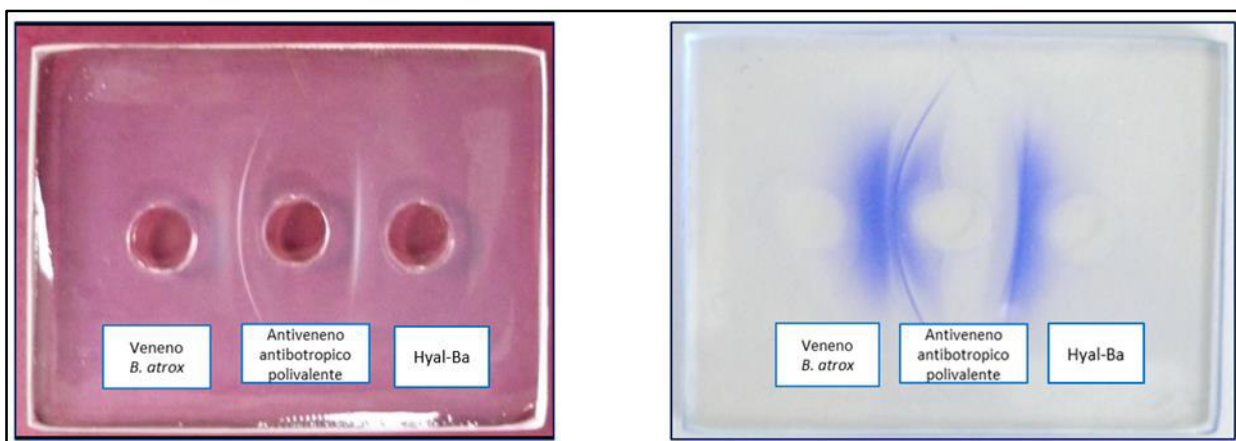


FIGURA 16. Inmunodifusión doble (sin y con colorante) entre el veneno y la hialuronidasa de *B. atrox* frente al antiveneno botrópico polivalente.

5.10. Análisis Molecular

5.10.1. Amplificación y secuenciación de la Hyal-Ba.

A partir de 400 μL de veneno recién extraído mediante presión mecánica a un ejemplar de *Bothrops atrox* se obtuvo 40 μL de RNA total. Se verificó la presencia de RNA extraído procediéndose a realizar la cuantificación en el fluorómetro Qubit® 2.0 obteniéndose 6.32 $\mu\text{g/mL}$ de RNA total el mismo que, fue mantenido a -80°C . Luego de esto se procedió a realizar la conversión a cDNA con el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (NOVAGEN). Para la cuantificación del cDNA se realizó mediante un NanoDrop, utilizándose 2.5 μL del RNA obtenido, el cual nos dio una concentración de 1290,4 $\text{ng}/\mu\text{L}$. En un inicio se amplificaron por segmentos la secuencia del gen Hyal-Ba (8 segmentos) y luego se ensamblaron cada uno para poder obtener un rango de su secuencia completa. Finalmente se empleó los primers externos HD0: 5' ACCTCGTCGTCTCTGCGTGGCCTACA 3' (forward) y HD11: 5' CCACACAATACTTTAATATTTGGG 3' (reverse) a partir del alineamiento múltiple previamente diseñados y sintetizados para obtener la secuencia el gen Hyal-Ba.

En relación con los segmentos obtenidos mediante el protocolo 1 de amplificación antes mencionado se obtuvieron los siguientes amplicones.

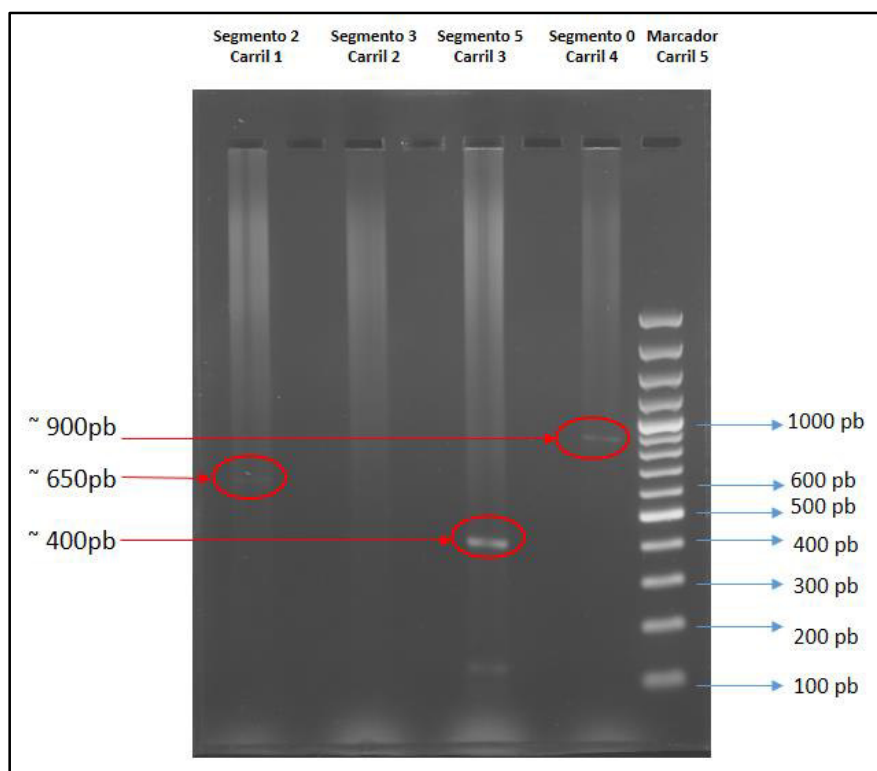


FIGURA 17. Electroforesis de amplicones para los Segmentos 2,3,4 y 0 del gen de la hialuronidasa para *Bothrops atrox*. (Utilizando el protocolo 1). No se observa amplicón del segmento 3.

Obteniéndose para cada par de cebadores: (Figura 17):

- Para el segmento 2 (HD2 + HDr4) una banda no muy definida de aproximadamente de 650 pb
- Para el segmento 3 (HD3 + HDr7) no se observan bandas definidas mediante este protocolo.
- Para el segmento 5 (HD5 + HDr7) se noto una banda bien definida de 400 pb aproximado y 1 banda acompañante tenue de aproximandamente 100 pb.
- Se utilizó los cebadores de *Bothrops pauloensis* (Hyase F + Hyase R) para comparar con nuestros segmentos obtenidos y se obtuvo 1 banda definida de aproximadamente 1000 pb (Segmento 0).

Utilizando el protocolo 2 (Página 38) de amplificación se obtuvieron los siguientes resultados:

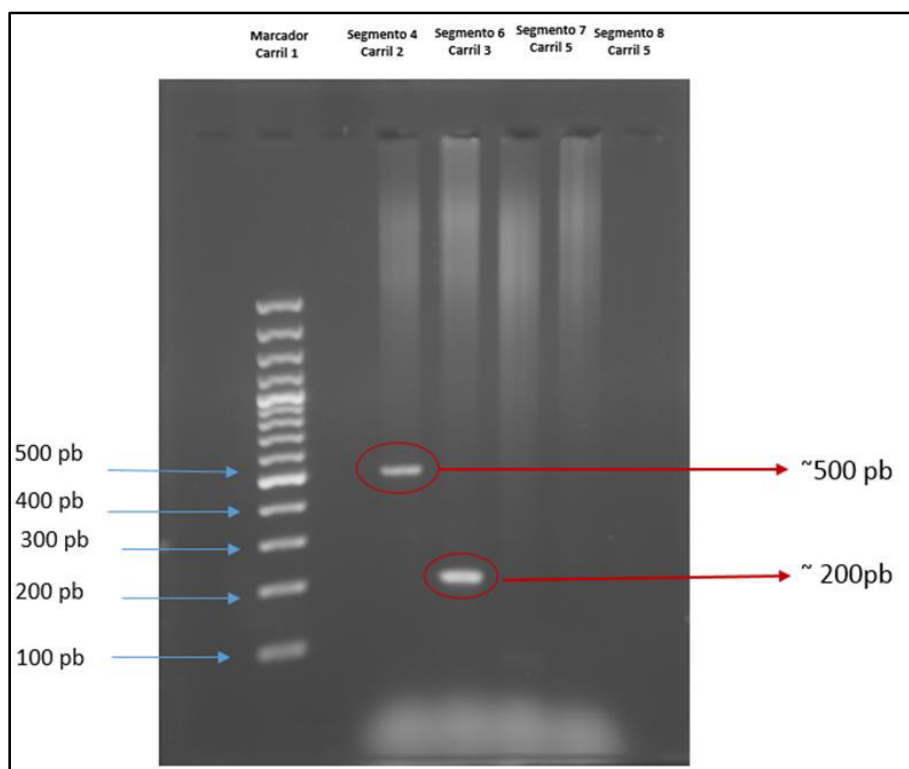


FIGURA 18. Electroforesis de amplicones para los Segmentos 4, 6,7 y 8 del gen de la hialuronidasa para *Bothrops atrox*. (Utilizando el protocolo 2). No se observan amplicones del segmento 7 y 8.

Se obtuvieron para cada par de iniciadores: (Figura 18):

- Para el segmento 4 (HD5 + HDr8) se observa una banda bien definida de aproximadamente 500 pb.
- Para el segmento 6 (HD6 + HDr8) se observa una banda bien definida de aproximadamente 200 pb.
- Para lo segmentos 7 (HD5 + HDr10) y 8 (HD6 + HDr10) no se observaron bandas definidas.

Se trabajo también con otras temperaturas entre 52- 60 °C; pero solo las temperaturas utilizadas de 60 °C y 56°C fueron para hibridación respectivamente. Estos protocolos permitieron la amplificación de cinco de los segmentos del gen de la enzima hialuronidasa de *Bothrops atrox*.

El segmento 2 previamente amplificado se observó por electroforesis en agarosa que su banda era tenue por la cual se empleó un kit (Accu Prep ®PCR Gel Purification kit) en el cual se cortó la banda proveniente de la electroforesis, luego

se purificó la respectiva banda y posteriormente se reamplificó este fragmento con los mismos primers utilizados previamente.

Para Nested PCR del segmento 2 se cambió el protocolo normal de PCR ya que se empleó el Kit Taq Platinum y se usó nuevamente los primers HD2 y HDr4

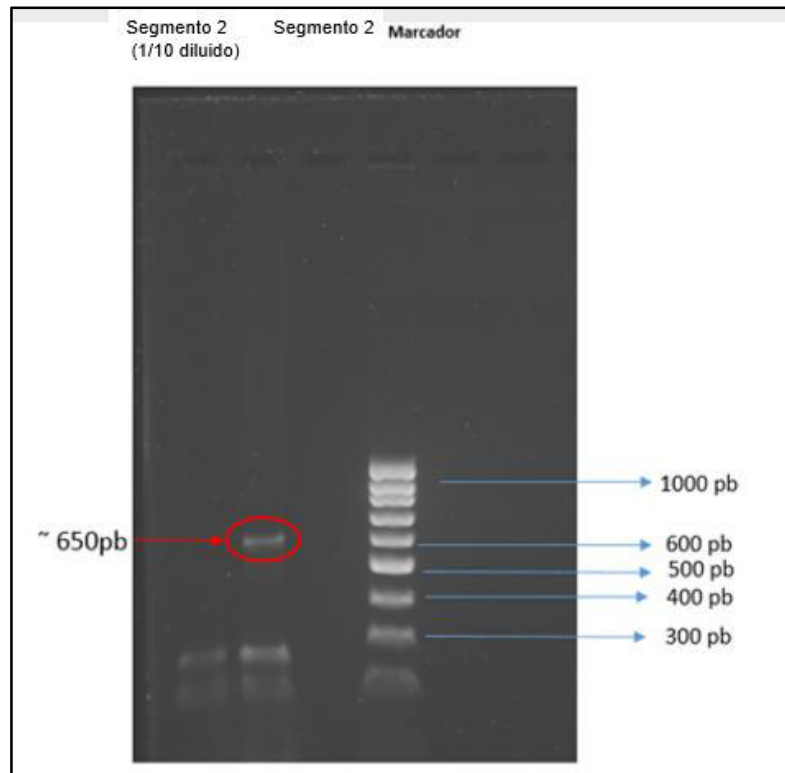


FIGURA 19. Electroforesis del reamplificado del segmento 2 del gen de la hialuronidasa para *Bothrops atrox*. Para el PCR se empleó muestra normal obteniéndose una banda de 650 pb y muestra diluida (1/10) en donde en ambos casos se observa algunas bandas de dímeros.

Luego del ensamblaje de los segmentos obtenidos, mediante los resultados del secuenciamiento permitió la obtención de una secuencia constituida por 2020 pb la cual, analizada por el algoritmo BLASTn, evidenció una notoria homología con otras secuencias pertenecientes a hialuronidasas de origen ofídico colocadas en la base de datos del NCBI (Tabla 10).

TABLA 10. Homología de las secuencias nucleotídica de Hyal-Ba con otras hialuronidasas depositas en el GenBank (E value=0.0)

Especie	Accesión	Identificador	Cobertura	Homología
<i>Bothrops atrox</i>	KY499627.1	mRNA for hyaluronidase, complete cds	100%	100%
<i>Protobothrops mucrosquamatus 1</i>	XM_015822281.1	hyaluronidase (LOC107293142), transcript variant X1, mRNA : PREDICTED	98%	95%
<i>Protobothrops mucrosquamatus 2</i>	XM_015822287.1	hyaluronidase (LOC107293142), transcript variant X2, mRNA : PREDICTED	97%	94%
<i>Ovophis okinavensis</i>	AB851978.1	mRNA for hyaluronidase, complete cds	94%	97%
<i>Protobothrops flavoviridis</i>	AB851937.1	mRNA for hyaluronidase, partial cds	85%	97%

5.10.2. Obtención de la secuencia de la proteína

Para deducir la secuencia proteica de Hyal-Ba, se utilizó el principio de encontrar a los ORFs en las 6 posiciones más factibles. En el análisis inicial mediante el programa ORF Finder, se obtuvo marcos de lectura grandes, ya que este programa localiza los ORF tomando en cuenta la ubicación del codón de inicio (AUG). El análisis con el Programa ORF finder dio un marco de lectura +1, con búsqueda limitada al codón de iniciación ATG (Figura 20), para una secuencia proteica de 449 aminoácidos. Para confirmar que la secuencia era codificante se utilizó el programa Translate Tool, ejecutando la traducción de los codones dentro de los 6 marcos de lectura probables. La proteína deducida (Figura 21) se enmarca a partir del nucleótido 178 hasta el nucleótido 1527 con el codón stop TAA determinándose una región nucleotídica no traducida 5' (UTR 5') de 177 pb y una UTR 3' de 669 pb, mostró también homología significativa con

diversas secuencias de hialuronidasas guardadas en la base de datos (Tabla 11).

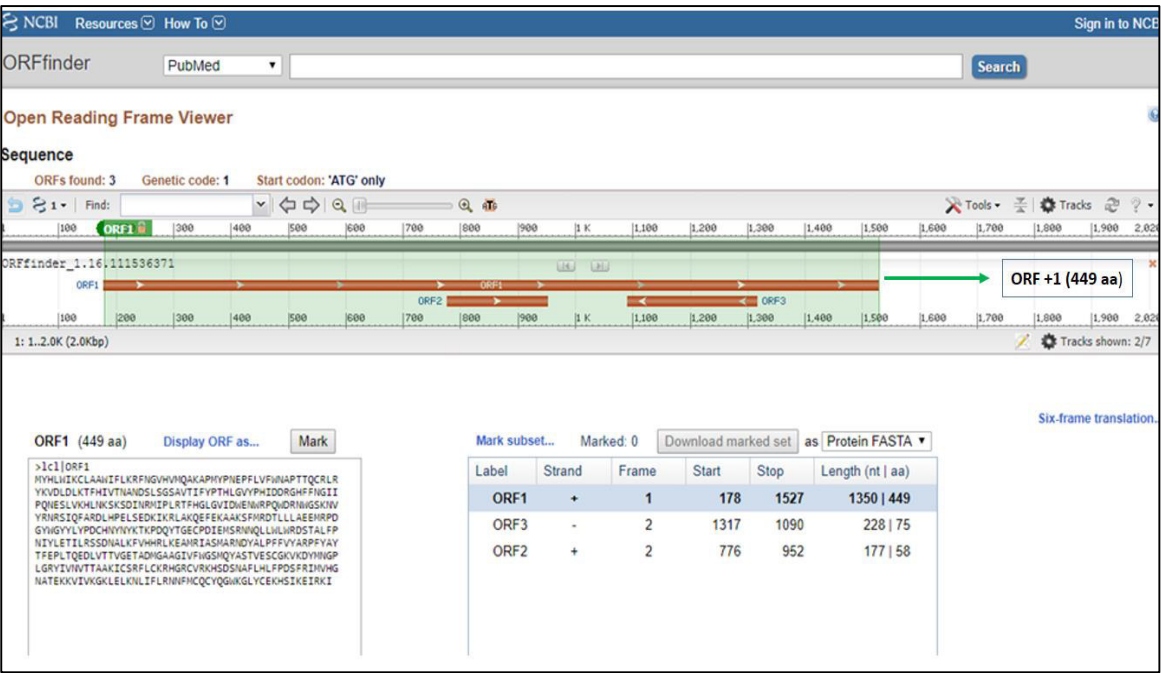


FIGURA 20. Identificación de los marcos de lectura abierta para secuencia nucleotídica de Hyal-Ba con el Programa ORF Finder

```

acctcgtcgtctctcgtcgtggcctacatttgggtctttgcttcactggggctttggaactgcttcttttct 69
gggacctgtttcaactgcccttgtcttgtgtctggaccctacctgggtggattggacttggaaacctgga 138
ccttgcctgaactaacagcaccagaaaaatctgcatattatgtatcacctatggatcaaagtgcctggca 207
1 M Y H L W I K C L A
gcttggatatttctgaagagatttaattggagttcatgttatgcaggccaaagctccaatgtatccta 276
11 A W I F L K R F N G V H V M Q A K A P M Y P N
gagccttttcttgtgttctggaatgcacctaccaccaatgtcggctgcgtctataaggtggatttagat 345
34 E P F L V F W N A P T T Q C R L R Y K V D L D
cttaagactttttcacattgtaacaaatgccaatgactctttaagtgggtctgctgtgacaatattttat 414
57 L K T F H I V T N A N D S L S G S A V T I F Y
cctaccatttgggagtctatcccatattgatgacctgggcattttcttcaatgggattataaccgcaa 483
80 P T H L G V Y P H I D D R G H F F N G I I P Q
aacgaaagcctcgtgaaacatctcaataaatcaaaatcggatattaatcgtatgatccactgcgga 552
103 N E S L V K H L N K S K S D I N R M I P L R T
tttcatggacttggagtcattgactgggaaaactggagaccccgatgggatagaaactggggcagtaaa 621
126 F H G L G V I D W E N W R P Q W D R N W G S K
aatgtttacagaaacagatctattcaatttgcctagagatttgcacccagaattgtctgaagataaaatc 690
149 N V Y R N R S I Q F A R D L H P E L S E D K I
aagagattagctaagcaggaatttgaaaaagctgcaaagagtttcatgagagatacacttttactagct 759
172 K R L A K Q E F E K A A K S F M R D T L L L A
gaagaaatgcgaccagatggatattggggctactatctgtatccagattgccataattataattataag 828
195 E E M R P D G Y W G Y Y L Y P D C H N Y N Y K
acaaaacctgatcaatacacaggagaatgtccagatattgaaatgtcacggaataatcagctactttgg 897
218 T K P D Q Y T G E C P D I E M S R N N Q L L W
ctatggagagacagtactgcccttttttctaataatataatcttgaaccatattgaggtcaagtgaaca 966
241 L W R A D S T A L F F P N I Y L E T I L R S S D N
gctttgaaatttgtgcaccatgccttaagaagaatgcgcatttgcctccatggctaggaattgattac 1035
264 A L K F V H H R L K E A M R I A S M A R N D Y
gccttgcctttttttgtatatgccaggccgttctatgcatatacctttgaacctttaacacaggaagac 1104
287 A L P F F V Y A R P F Y A Y T F E P L T Q E D
ttgggtgactactgttgggtgaaacagcagacatgggggcagcaggaattgtcttttggggaagcatgcaa 1173
310 L V T T V G E T A D M G A A G I V F W G S M Q
tatgccagtagcgttgaaagctgtggaaaagtgaagactatatgaatgggtccattgggacgttatatc 1242
333 Y A S T V E S C G K V K D Y M N G P L G R Y I
gttaatgtaactactgcagccaagatttgcagccgttttcttttgcaagagacatggaagatgtgttcga 1311
356 V N V T T A A K I C S R F L C K R H G R C V R
aaacatagtgtattcaaatgccttttctacacttgttttctgatagtttcaggatcatggtgcatggcaat 1380
379 K H S D S N A F L H L F P D S F R I M V H G N
gcaacagaaaaaaaagtgtattgtaaaaggaaaattggagttgaagaatttgattttcttaagaaataac 1449
402 A T E K K V I V K G K L E L K N L I F L R N N
tttatgtgccagtgttaccaaggttgaaaggactatattgtgaaaagcattctataaaagagataagg 1518
425 F M C Q C Y Q G W K G L Y C E K H S I K E I R
aaaatataaggaaattaaatgcattgaagagtctttcattttattcccaaacaaaacaaaattgtcacac 1587
448 K I -
agatcacaaagacaaagaatccagctttgatctgagggcaatttctattagatcttctgaagacttgcaa 1656
atatgtataacttttaagttttctaagcaaaaataagatactgtaattaaaaattaaggaaaaaaaggaca 1725
caggtggttgtgtactgtaatgtgcttttgggaggaaggaggagacatgactgttttcagatcttgggtc 1794
tacctaattaaaaacctttgcttcccttttttctcgcatccacttggagtggtctttgcttacttcta 1863
acttcttcagagtcttcagaagtgaatttaggaatgcattcttgtttacaattgcagccacatttttttc 1932
ttctaccctcaccctccctccctccctccctccctccctccctccctccctccctccctccctccctcc 2001
ttttttaattttattataac 2020

```

FIGURA 21. Secuencia de nucleotídica y secuencia de aminoácídica inferida de Hyal-Ba. Los números de derecha e izquierda de la figura se refieren a nucleótidos y de aminoácidos respectivamente. El péptido señal está subrayado. El residuo catalítico conservado (E¹³⁵) y los residuos posicionales (D¹³³, Y²⁰⁶, Y²⁵³, W³²⁸) se resaltan en negro y gris, respectivamente. La terminación de ORF por el codón TAA está indicada por un guión (-). Los cuatro motivos de N-glicosilación más presuntivos están resaltados en recuadros (N¹⁰³, N¹¹¹, N¹⁵³ y N³⁵⁷).

TABLA 11. Homología de la secuencia proteica de la Hialuronidasa con otras depositas en el GenBank

Espece	Accesión	(E value)	Cobertura	Homología
<i>Bothrops atrox</i>	AUF71538.1	0.0	100%	100%
<i>Bothrops moojeni</i>	ATU85542.1	0.0	100%	98%
<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	XP_015677767.1	0.0	100%	96%
<i>Protobothrops flavoviridis</i>	BAP39986.1	0.0	100%	95%
<i>Ovophis okinavensis</i>	BAN89413.1	0.0	100%	95%

De acuerdo con los datos obtenidos en la deducción de la proteína, mediante el programa Signal P nos predijo la localización y el sitio de clivaje del péptido señal (Figura 22), el cual arrojo que los 20 primeros aminoácidos en la posición N-terminal conforman parte del péptido señal, los 429 aminoácidos restantes conforman a la proteína madura que al ser analizadas con el programa BLASTp determinan homología con otras hialuronidasas siendo la hialuronidasa de *Bothrops moojeni* (ATU85542) la de mayor identidad (98%) con una longitud de cubierta del 100%. La secuencia proteica de *Bothrops atrox*, producida en el presente estudio, fue denominada como Hyal-Ba y también se le depositó en la base de datos con el código de acceso AUF71538.

Por otro lado, se realizó un análisis de preferencia por el uso de codón (Codon Usage), que se muestra en la Tabla 12, en donde se resaltan aquellos codones con mayor frecuencia singular en uso, realizando una comparación con las hialuronidasas de *Protobothrops flavoviridis*, *Ovophis okinavensis* y también con la enzima LAAO de *Bothrops atrox*.

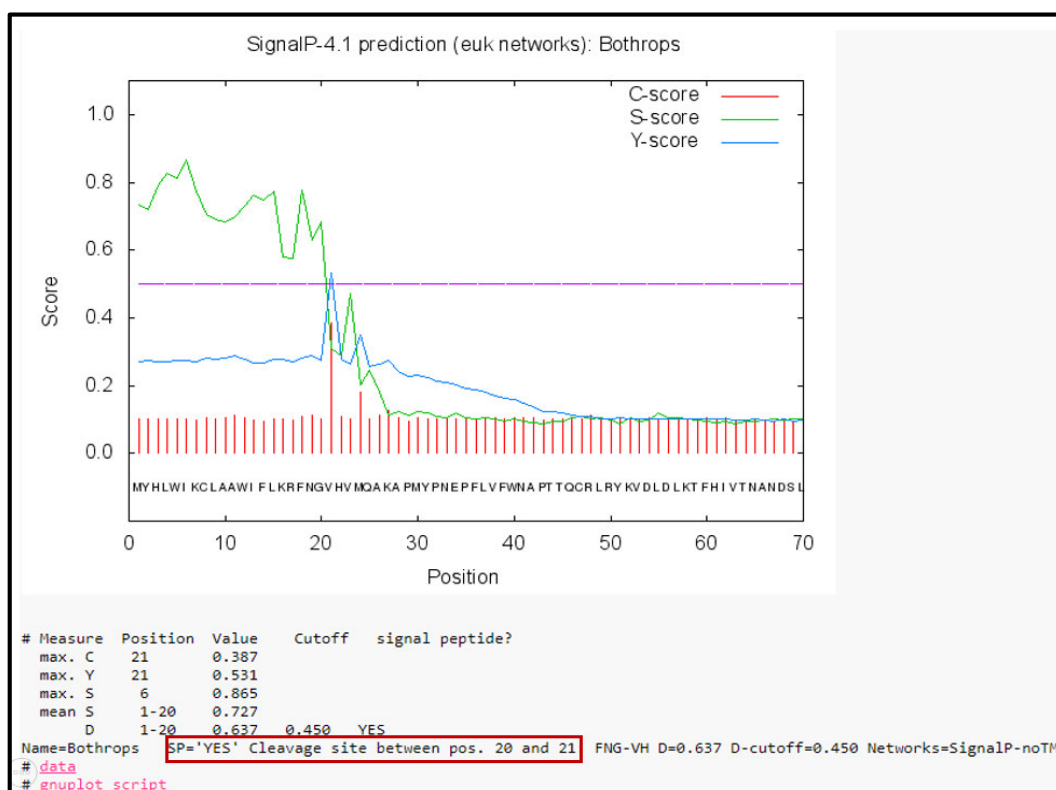


FIGURA 22. Determinación del péptido señal de la Hyal-Ba, indicando que el sitio de clivaje se encuentra entre el aminoácido 20 y 21 (SignalP 4.1 Server)

5.10.3. Análisis de la proteína deducida.

El análisis de la secuencia primaria con el programa ProtParam (ExPASy.org) deduce un peso molecular de 50108,58 Daltons con un punto isoeléctrico teórico de 9.19 estimando la naturaleza básica de la enzima, la formula química fue determinada como $C_{2265}H_{3461}N_{623}O_{622}S_{23}$ obteniéndose un total de 6994 átomos. El coeficiente de extinción molecular fue de $88405 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y un índice alifático de 76,15. Otros parámetros fisicoquímicos se detallan en la Tabla 14. La composición de los aminoácidos de la proteína madura se muestra en la Figura 23 y Tabla 13, el aminoácido más abundante de la proteína fue la leucina (37 residuos, 8.6%) en tanto que la cisteína y el triptofano fueron los menos abundantes (ambas con 10 residuos, 2.3%).

TABLA 12. Comparación del uso de codón para la enzima hialuronidasa entre especies ofídicas y la enzima L-aminoácido oxidasa de *B. atrox*.

AmAcid	Codon	HYAL B.atrox	HYAL Prot. flaviridis	HYAL Ovop. okinavensis	LAO B.atrox
		Frecuencia	Frecuencia	Frecuencia	Frecuencia
Ala	GCG	0.00	0.14	0.11	0.06
	GCA	0.38	0.55	0.27	0.28
	GCT	0.38	0.18	0.38	0.31
	GCC	0.25	0.14	0.24	0.36
Cys	TGT	0.59	0.48	0.57	0.43
	TGC	0.41	0.52	0.43	0.57
Asp	GAT	0.62	0.50	0.64	0.68
	GAC	0.38	0.50	0.36	0.32
Glu	GAG	0.21	0.31	0.19	0.35
	GAA	0.79	0.69	0.81	0.65
Phe	TTT	0.61	0.76	0.65	0.71
	TTC	0.39	0.24	0.35	0.29
Gly	GGG	0.21	0.29	0.23	0.21
	GGA	0.55	0.32	0.44	0.32
	GGT	0.09	0.21	0.18	0.26
	GGC	0.15	0.18	0.15	0.21
His	CAT	0.63	0.92	0.75	0.83
	CAC	0.37	0.08	0.25	0.17
Ile	ATA	0.35	0.29	0.31	0.13
	ATT	0.47	0.48	0.48	0.47
	ATC	0.18	0.23	0.21	0.41
Lys	AAG	0.32	0.34	0.25	0.56
	AAA	0.68	0.66	0.75	0.44
Leu	TTG	0.26	0.30	0.18	0.19
	TTA	0.18	0.14	0.14	0.14
	CTG	0.15	0.13	0.10	0.24
	CTA	0.15	0.13	0.12	0.11
	CTT	0.21	0.24	0.30	0.22
	CTC	0.05	0.06	0.17	0.11
Met	ATG	1.00	1.00	1.00	1.00
Asn	AAT	0.78	0.61	0.64	0.73
	AAC	0.22	0.39	0.36	0.27
Pro	CCG	0.06	0.07	0.04	0.15
	CCA	0.29	0.37	0.28	0.15
	CCT	0.42	0.33	0.39	0.35
	CCC	0.23	0.22	0.28	0.35
Gln	CAG	0.47	0.33	0.40	0.56
	CAA	0.53	0.67	0.60	0.44
Arg	AGG	0.19	0.16	0.21	0.14
	AGA	0.46	0.59	0.44	0.36
	CGG	0.08	0.03	0.08	0.07
	CGA	0.05	0.11	0.08	0.18
	CGT	0.14	0.05	0.10	0.21
	CGC	0.08	0.05	0.10	0.04
Ser	AGT	0.17	0.18	0.18	0.19
	AGC	0.13	0.16	0.11	0.19
	TCG	0.06	0.07	0.03	0.00
	TCA	0.19	0.18	0.18	0.25
	TCT	0.38	0.23	0.31	0.25
	TCC	0.08	0.18	0.18	0.13
Thr	ACG	0.03	0.14	0.00	0.15
	ACA	0.41	0.21	0.44	0.33
	ACT	0.31	0.38	0.37	0.33

	ACC	0.25	0.38	0.20	0.19
Val	GTG	0.47	0.11	0.44	0.29
	GTA	0.12	0.16	0.13	0.26
	GTT	0.24	0.32	0.26	0.23
	GTC	0.18	0.42	0.18	0.23
Trp	TGG	1.00	1.00	1.00	1.00
Tyr	TAT	0.63	0.65	0.66	0.70
	TAC	0.37	0.35	0.34	0.30
End	TGA	0.43	0.47	0.27	0.00
	TAG	0.00	0.16	0.13	0.00
	TAA	0.57	0.38	0.60	0.00

TABLA 13. Composición de los aminoácidos de Hyal-Ba.

Aminoácido	%	Cantidad	Aminoácido	%	Cantidad
Ala (A)	6.1%	26	Lys (K)	7.0%	30
Arg (R)	6.5%	28	Met (M)	3.0%	13
Asn (N)	6.1%	26	Phe (F)	5.4%	23
Asp (D)	5.4%	23	Pro (P)	4.7%	20
Cys (C)	2.3%	10	Ser (S)	5.4%	23
Gln (Q)	2.8%	12	Thr (T)	4.9%	21
Glu (E)	4.9%	21	Trp (W)	2.3%	10
Gly (G)	5.1%	22	Tyr (Y)	5.1%	22
His (H)	3.7%	16	Val (V)	5.4%	23
Ile (I)	5.4%	23	Pyl (O)	0.0%	0
Leu (L)	8.6%	37	Sec (U)	0.0%	0

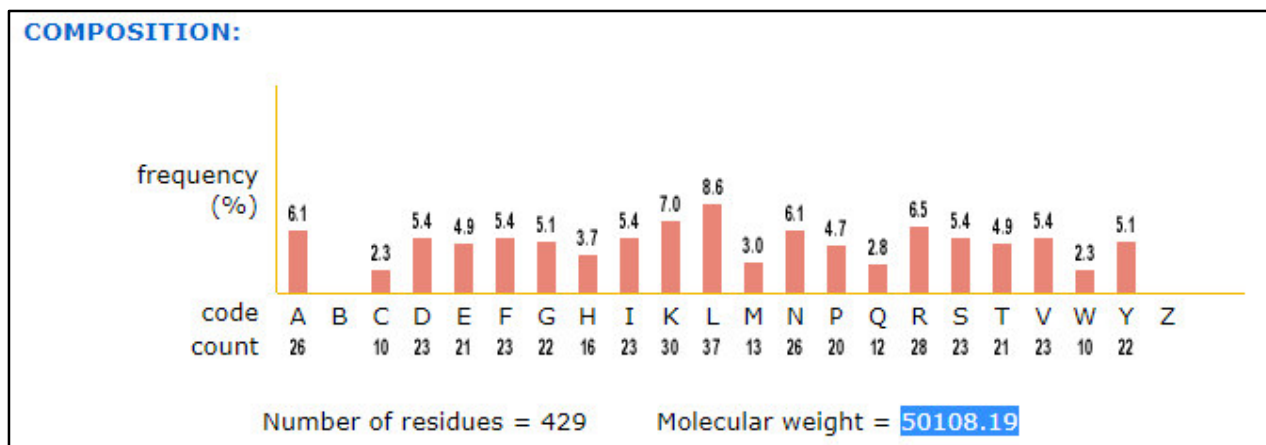


FIGURA 23. Análisis de la composición de aminoácidos de la proteína madura

TABLA 14. Parámetros físicos y químicos conseguidos para la proteína Hyal-Ba por el programa ProtParam (Caracterización *in silico*)

PARÁMETROS FÍSICOS Y QUÍMICOS DE Ba-Hyal	
Peso molecular	50.108 kDa
Punto Isoeléctrico	9.19
Número total de residuos cargados negativamente (Asp +Glu)	44
Número total de residuos cargados positivamente (Arg + Lys)	58
Índice alifático	76.15
GRAVY	-0.445
Tiempo de vida media	100 horas en reticulocitos de mamíferos (in vitro) >20 horas en levaduras (in vivo) >10 horas en E. coli (in vivo)
Índice de inestabilidad	34.10 (proteína estable)

Para determinar los motivos para N-glicosilación, estos fueron elaborados mediante el programa NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) que nos proporcionó 6 supuestas posiciones de N-glicosilación ya que corresponden a los residuos de asparragina (Ver Figura 24). Sin embargo, los residuos en las posiciones N¹⁰³, N¹¹¹, N¹⁵³ y N³⁵⁷ resultaron con un buen score para la glicosilación.

(Threshold=0.5)				
SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
Bothrops	67 NDSL	0.4469	(5/9)	-
Bothrops	103 NESL	0.5282	(7/9)	+
Bothrops	111 NKSK	0.7543	(9/9)	+++
Bothrops	153 NRSI	0.7032	(9/9)	++
Bothrops	357 NVTT	0.5970	(8/9)	+
Bothrops	401 NATE	0.4854	(5/9)	-

FIGURA 24. Determinación de los motivos de N- glicosilación en las posiciones Asn⁶⁷, Asn¹⁰³, Asn¹¹¹, Asn¹⁵³, Asn³⁵⁷ y Asn⁴⁰¹ (NetNGlyc)

5.10.4. Alineamiento múltiple de la Hyal-Ba.

En el alineamiento múltiple (Ver Fig. 25) se destacan las regiones conservadas de como el residuo catalítico Glu113 y los residuos posicionales Asp111, Tyr184, Tyr230 y Trp305 (de acuerdo a Stern y Jedrzejak 2006, pero sin considerar el péptido señal). La presencia de las cisteínas se mantiene conservada en todas las secuencias de hialuronidasas: Cys47, Cys211, Cys227, Cys340, Cys365, Cys370, Cys376 Cys427, Cys429 y Cys438. Hyal-Ba presenta tres mutaciones únicas en las posiciones Asn284, Phe290 y Asp319.

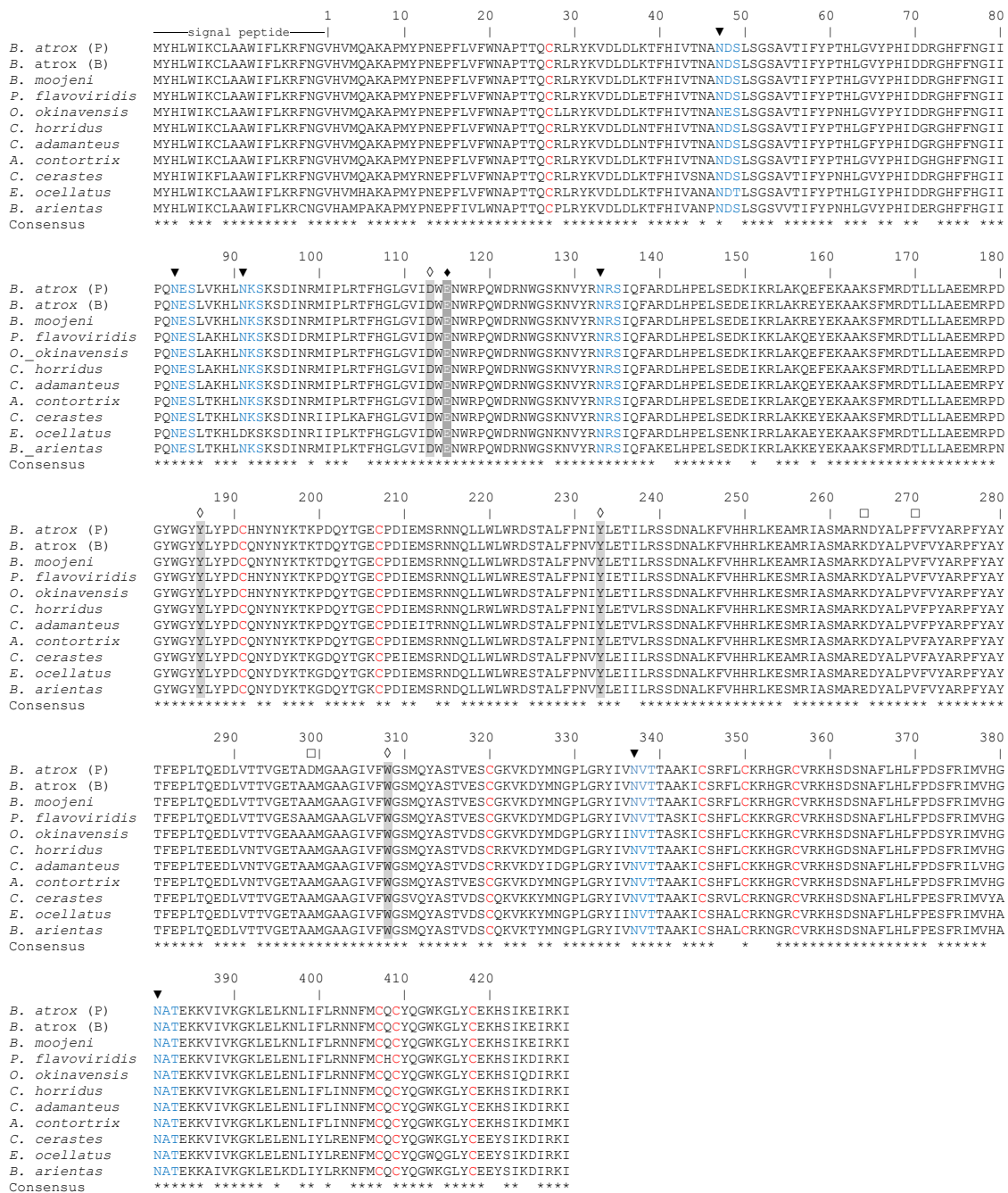


FIGURA 25. Alineamiento de la secuencia inferida de la hialuronidasa de *Bothrops atrox* de Perú (P) con otras hialuronidasas ofídicas. A) En celeste (▼) se resaltan los motivos para la N glicosilación (N47, N83, N91, N133, N337 y N381). En rojo se resaltan los residuos de cisteína en posición conservada. En gris oscuro (◆) el residuo catalítico (E115) y en gris claro (◇) los sitios de posicionamiento (D113, Y186, Y233 y W309). En fucsia (□) se resaltan los aminoácidos singulares en Hyal-Ba. Las secuencias empleadas fueron de *Agkistrodon contortrix contortrix* (JAS04369), *Bothrops atrox* de Brasil (B) (JAV01892), *Bothrops moojeni* (ATU85542), *Protobothrops flavoviridis* (BAN89379), *Crotalus horridus* (JAS04874), *Ovophis okinavensis* (BAN89413), *Crotalus adamanteus* (J3S820), *Cerastes cerastes* (A3QVN5), *Echis ocellatus* (A3QVN2) y *Bitis arietans* (A3QVN9).

5.10.5. Análisis filogenético.

El análisis filogenético (Figura 26) determinó la formación de agrupamientos definidos, como el conformado por el grupo de las hialuronidasas de serpientes.

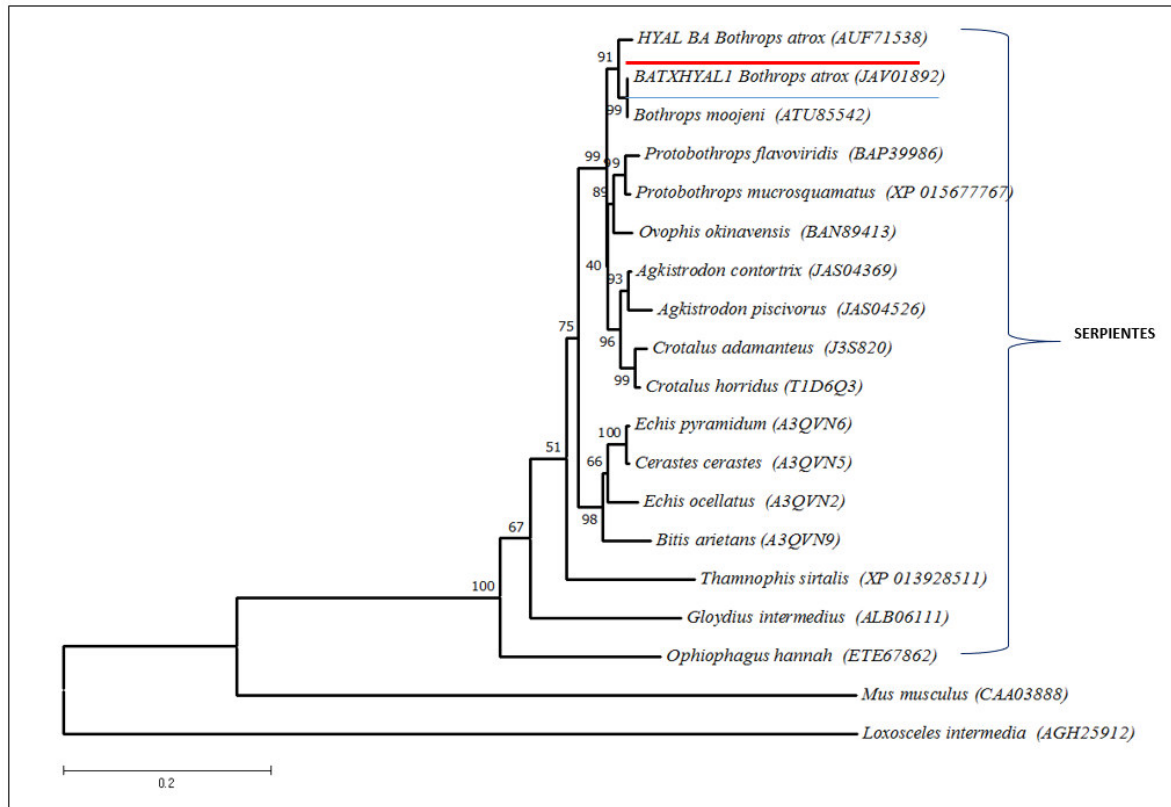


FIGURA 26. Arbol filogenético de hialuronidasas de diversas especies.

En el análisis filogenético (Figura 27) Hyal-Ba se agrupa consistentemente con la hialuronidasa de *B. atrox* de Brazil y *B. moojeni*, nosotros denominamos a este clado como el “Clado *Bothrops*”, este clado esta agrupado con el clado conformado por *Protobothrops* y *Ovophis* Clado (PO). Ambos clados son agrupados dentro del Clado Crotalinae junto a otro clado formado por los Géneros *Crotalus* y *Agkistrodon*. Otro clado semejante al Clado Crotaline es el clado Viperinae, (géneros *Echis*, *Cerastes* y *Bitis*) que en su conjunto forman el clado Viperidae. En la tabla se muestran las mutaciones para el clado *Bothrops* (Ver Tabla 15).

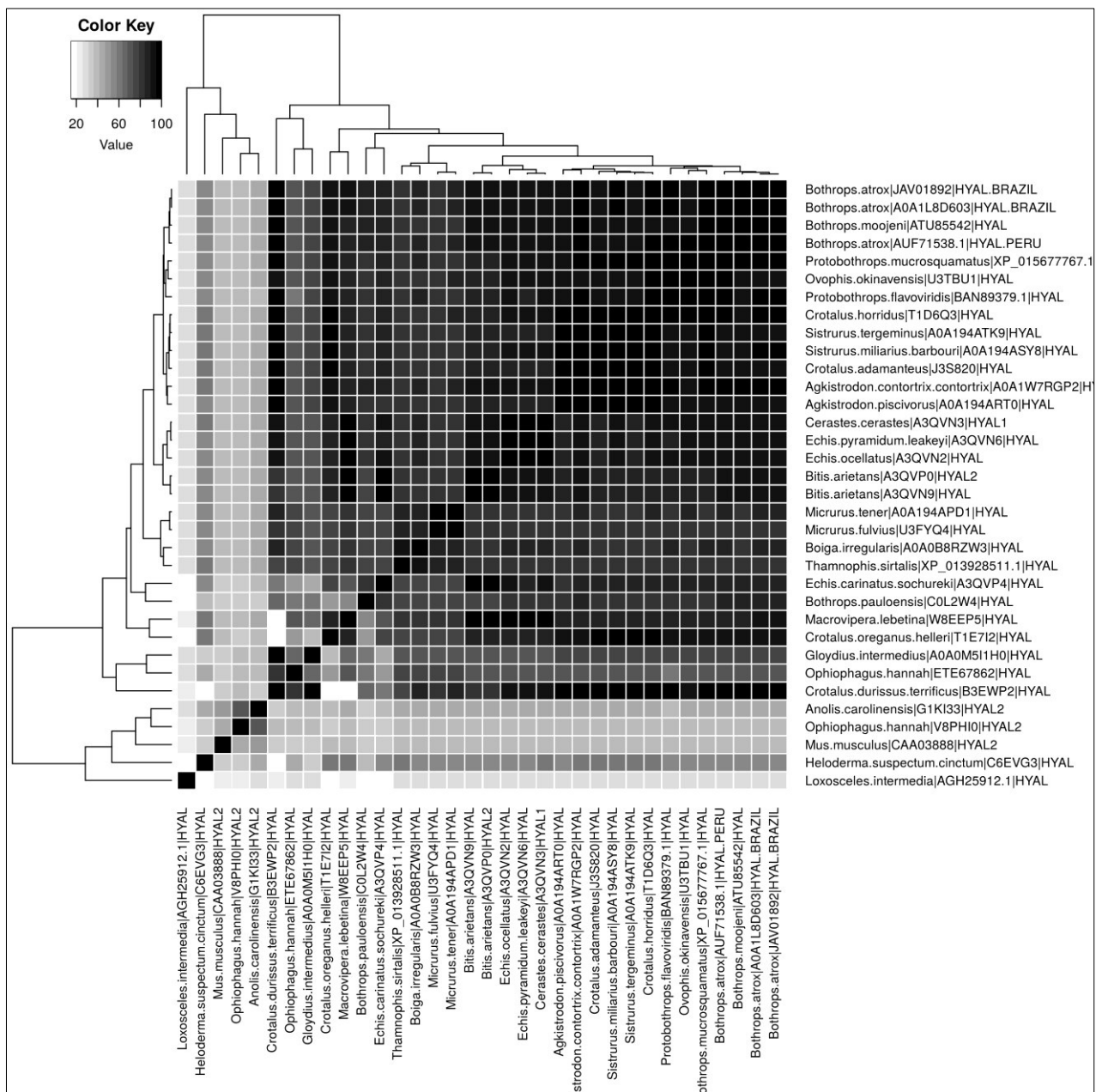


FIGURA 27. Matriz de Identidad y Árbol Neighbor Joining para Hialuronidasas de diversas especies. La alineación para producir la matriz de identidad se realizó con Clustal Omega basado en HMM. Esta figura muestra la identidad entre las secuencias en porcentaje. Las claves de color van desde el cero de identidad (blanco) a 100% (negro). El cladograma se encuentra a la izquierda de la figura y los nombres de las especies a la derecha. Las gráficas de la figura fue producida en el software R.

TABLA 15. Mutaciones singulares de la hialuronidasa del clado *Bothrops*.

Posición	Clado <i>Bothrops</i>	Otros Clados
275	Ala	Ser
367	Arg	His
416	Lys	Glu
445	Glu	Asp

5.10.6. Modelamiento de la estructura de la Hyal-Ba.

Por otro lado, los análisis para el modelamiento estructural de Hyal-Ba determinaron a la hialuronidasa humana (PDB ID: 2PE4) como el mejor molde (40% de identidad y 91% query cover). La estructura obtenida corresponde a un plegamiento TIM barrel (α/β)₈ entre los residuos 36 – 356 y un dominio EGF-Like entre los 358 y 440 (Figura 28A). Los valores ERRAT, PROCHECK (91.72) y VERIFY3D (89.35%) indican la buena calidad de la estructura. El análisis de Ramachandran indica que el 95.3% de los aminoácidos se encuentran en una posición favorable, el 4% en una región permitida y el 0,7% en una región generosamente permitida (Figura 29). El análisis por PROSA indica un valor Z-score de -10.21 confirmando la credibilidad del modelo generado para Hyal-Ba. Los sitios de N glicosilación predichos se encuentran distantes al sitio catalítico y 5 puentes disulfuro que participarían en la estabilidad de la estructura (Figura 28B), también se determinó la carga total de la proteína, así como de su sitio activo (Figura 28C). El valor RMSD de la superposición de los C alfa con el templado fue de 0.68 Å (Figura 28D)

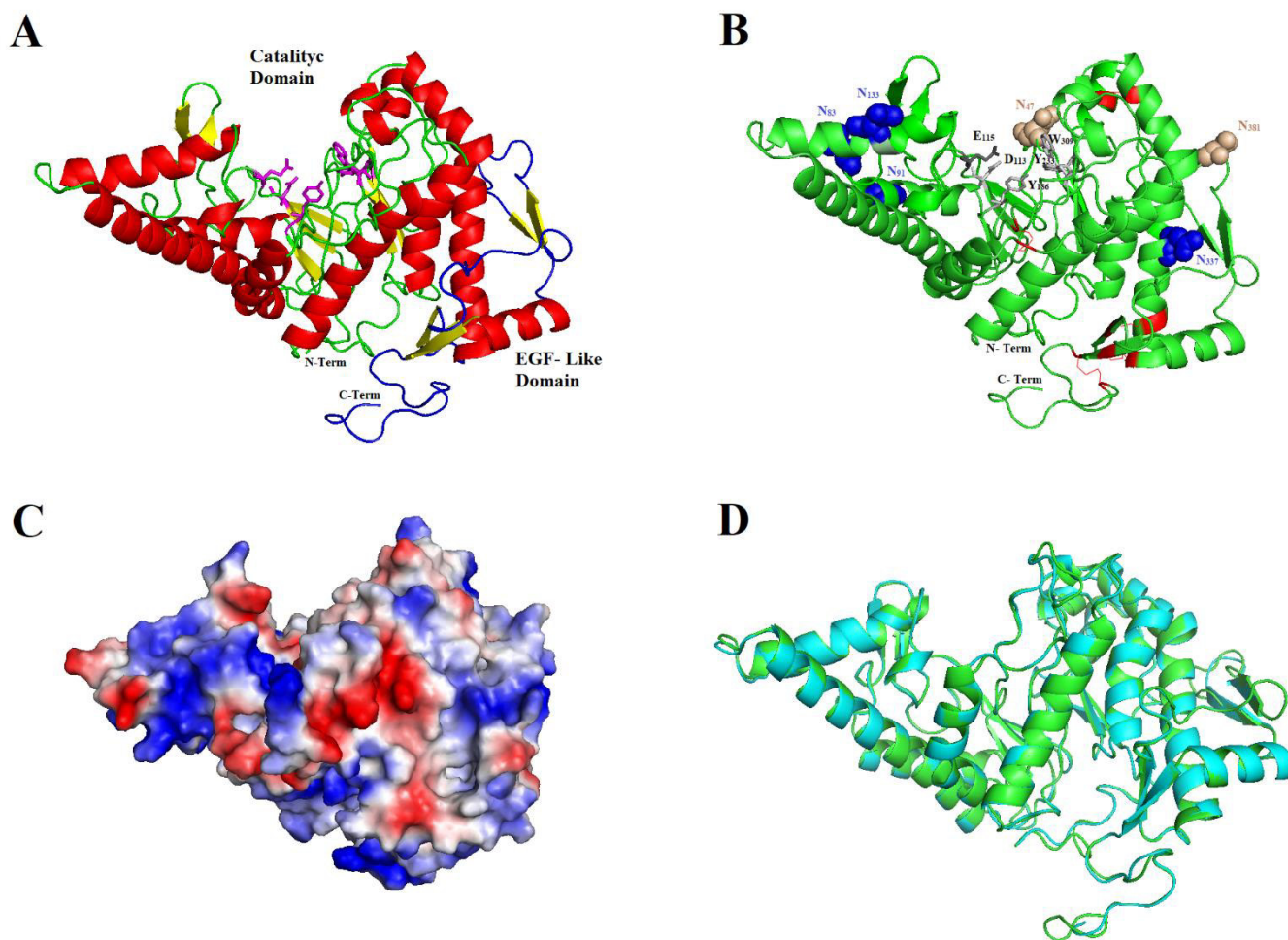


FIGURA 28. Modelamiento de la estructura de Hyal-Ba A) La representación muestra las características estructurales secundarias y los dominios catalítico (verde) y like-EFG (azul). Los residuos funcionales pertenecen al dominio catalítico están en la representación de palo magenta. Las estructuras helices y las β -planares están en rojo y amarillo respectivamente. B) Los residuos principales en Hyal-Ba, los puentes disulfuro se resaltan en rojo, los sitios predichos de N-glicosilación (N47, N83, N91, N133, N337 y N381) están en esferas azules (score principal) y marrón claro (score bajo) . Los residuos funcionales (E115, D113, Y186, Y233 y W309) C) El potencial electrostático de la superficie molecular de los potenciales negativos y positivos de Hyal-Ba estan en rojo y azul, respectivamente. D) Superposición de Alpha C de Hyal-Ba (verde) con la estructura de Hialuronidase humana 1 (PDB: 2PE4).

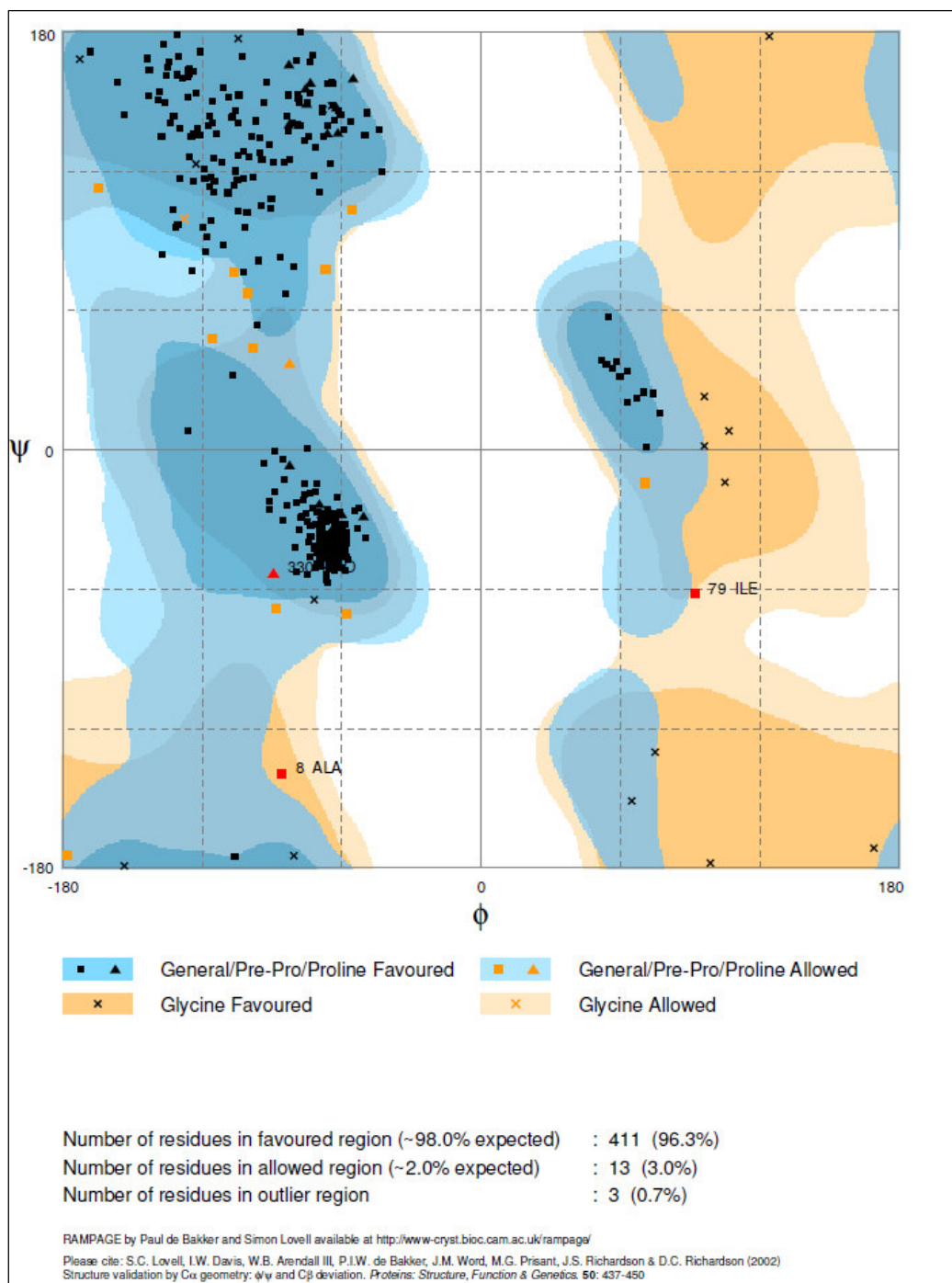


FIGURA 29. Plot de Ramachandran obtenido para el modelo estructural generado para Hyal-Ba. Generado por el servidor RAMPAGE.

6. DISCUSIÓN

6.1. PURIFICACIÓN DE HYAL-Ba DEL VENENO DE *Bothrops atrox*

En relación a la purificación de esta hialuronidasa, uno de los principales inconvenientes que se presenta al tratar de aislar y evaluar las características bioquímicas y biológicas de esta enzima, es el de emplear una técnica cromatográfica idónea ya que, esta proteína tiene una marcada inestabilidad frente a las condiciones de temperatura y de pH. Las técnicas de purificación más empleadas para los venenos de serpientes son las cromatografías de exclusión molecular, de intercambiador iónico y la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

En el presente trabajo se aisló una hialuronidasa del veneno de la serpiente *B. atrox*, previamente se trabajó con varios tipos de columnas de purificación como la columna de Sephadex G-75 continuado por una columna de DEAE Sephadex A-50, también se empleó los dos pasos cromatográficos descritos por Gonzalez *et al.*, (2013) pero la enzima no llegaba a estar pura, finalmente se optó por una nueva metodología que consistía en tres pasos cromatográficos ya antes descritos con los cuales se pudo lograr la purificación de la enzima y con un buen rendimiento. (Figura 8). La presencia de esta enzima se determinó mediante el ensayo turbidimétrico de Di-Ferrante, lográndose 36 veces su purificación, un 30 % de rendimiento y una recuperación final de proteína activa del 0.86 % (Tabla 7).

Anteriormente se han reportado purificaciones de varias hialuronidasas a partir de venenos de origen animal con variadas metodologías cromatográficas. Así podemos mencionar la purificación y caracterización parcial de la hialuronidasa de la ponzoña de *A. acutus acutus* en la que se emplearon tres pasos cromatográficos; primero en CM Sephadex C-50 seguido por Sephadex G-75 y finalmente en CM Sephadex C-25 (Xu *et al.*, 1982), durante el primer paso se utilizó buffer fosfato 0.1 M a pH 6 como eluyente, la enzima se recuperó tras aplicar NaCl al 0.35 M. Con esta metodología se tuvo una purificación de 45 veces y un 6 % de rendimiento. Este trabajo sirvió de punto de partida para la

purificación de la hialuronidasa del veneno del lagarto *H. horridum horridum* (Tu y Hendon, 1983) donde se utilizaron los mismos 3 pasos cromatográficos descritos anteriormente. Así mismo, se han reportado hasta dos enzimas del tipo hialuronidasa de la ponzoña ofídica de *A. contortrix contortrix* empleándose columnas de Sephacryl S-200 HR seguida de CM-Sephadex C-25, en el segundo paso se aplicó al intercambiador catiónico NaCl al 0.6 M liberándose recién la enzima, se consiguió una purificación de 277 veces con un 16.6 % de rendimiento y un 0.1 % de recuperación de proteica (Kudo y Tu, 2001). En el caso de la ponzoña de la cobra africana *Naja naja* esta fue fraccionada por medio de las columnas de Sephadex G-75 y CM Sephadex C-25, descubriéndose dos isoformas de esta hialuronidasa nombradas NNH1 y NNH2 (Girish, 2004), en el primer paso por exclusión molecular se consiguió un 34 % de rendimiento, mientras que en el siguiente paso utilizando la columna de intercambiador catiónico se consiguió un 5 % de rendimiento. Cabe mencionar en el caso de NNH1 se obtuvo una purificación de 33 veces, un 5 % de rendimiento con un 0.15 % de recuperación de proteína y para la isoforma NNH2 se tuvo una purificación de 27 veces con un 0.35 % de rendimiento y un 0.01 % de recuperación de proteína.

Li *et al.*, en el 2010 aislaron la hialuronidasa del veneno de *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* utilizando tres pasos cromatográficos en columnas de DEAE-Sephadex A-25, CM- Sephadex C-25 y Sephadex G-75, resultando al final un rendimiento de 4.34 %, una purificación de 76.6 veces y una recuperación de proteína del 5.66 %.

La comparación de la cantidad de la enzima hialuronidasa presente en los venenos animales, indica que es más cuantioso en artrópodos con respecto a los reptiles como por ejemplo en el estudio de la hialuronidasa del escorpión negro *Palammeus gravimanus* (Morey *et. al.*, 2006), para su purificación se utilizaron las columnas de Sephadex G-75 y DEAE Celulosa lograndose un 39.2 % de rendimiento y una recuperación de proteína del 2.5 %.

En nuestro país, se iniciaron los primeros trabajos sobre hialuronidasa en 1992, a partir del veneno de *L. muta* para intentar purificar esta enzima, sin éxito

debido a la marcada inestabilidad que mostraba esta proteína en las columnas cromatográficas de Sephadex G-100 y en CM Sephadex C-50 las cuales fueron equilibradas con tampón acetato de sodio 0.1 M a pH 5 (Godoy, 1992); en la columna de Sephadex G-100 se obtuvo un rendimiento del 45.03 % y una purificación de 2.5 veces mientras que en el siguiente paso sobre la columna de CM-Sephadex C-50 sus valores bajaron teniéndose un rendimiento de 8.8 % y una purificación de 0.95. Se efectuaron cambios en el proceso de purificación de la hialuronidasa de *L. muta* ya que se tomó en cuenta la inestabilidad de la enzima mediante esta técnica, de esta manera se ensayó una nueva metodología de purificación que consistía en un unico paso cromatográfico empleandose la columna de CM Sephadex C-50 equilibrada con tampón citrato 0.1 M a pH 6.0, eluyéndose la enzima al aplicar 0.2 M de NaCl, con lo que se logró un rendimiento de 23.5 % y una purificación de 26.4 veces y una recuperación de proteína de 0.89 %, como se observa en este estudio la proteína fue más estable (Hurtado, 1997). En el 2006, Lerma volvió a evaluar otras características bioquímicas y biológicas de la hialuronidasa ya encontrada con anterioridad en el veneno de *L. muta*, las cuales se trataron de mejorar y optimizar la metodología de purificación, empleando esta vez cromatografías en columnas de Sephadex G-100 seguida por CM Sephadex C-50 equilibrada con buffer acetato de amonio 0.05 M pH 5.0 y eluyéndose la enzima con una gradiente de NaCl de 0 a 0.7 M; en este caso la enzima logró una purificación de 51.4 veces con un 38.6 % de rendimiento y una recuperación proteica de 0.76 %.

En el 2013, Delgadillo *et. al.*, empleó dos pasos cromatograficos sobre columnas de Sephadex G-75 y DEAE Sephadex A-50 para aislar la hialuronidasa de la serpiente peruana *Bothrops brazili*, se determinó mediante esta metodología que la hialuronidasa es separada del resto de los componentes enzimáticos del veneno en virtud a su masa molecular por medio de la resina de exclusión molecular y de su repulsión por el intercambiador aniónico DEAE Sephadex A-50 lo que permitió recuperarla en el volumen isocrático. Es así que la purificación conseguida para este estudio fue de 33 veces con un rendimiento de 54.5 %. Además, se obtuvo una recuperación de proteína del 1.6 % lo que nos indicaría

una mayor concentración de la enzima en el veneno total con respecto a otros venenos estudiados.

Por otro lado, la fuerte repulsión que tiene la hialuronidasa de *B. brazili* al intercambiador aniónico DEAE Sephadex A-50 pH 5, indicó que a este pH la enzima está cargada positivamente por lo que se justificó su repulsión y además se determinó como consecuencia de ello, que se trataría de una proteína básica con un punto isoeléctrico (pI) mayor a 5.5, ya que en columnas de CM Sephadex que tienen carga negativa, esta proteína es atrapada fuertemente y solo se libera usando altas concentraciones de NaCl mayores a 0.6 M tal como lo reportó Lerma (2006).

Gonzalez *et al.*, (2013), purificó parcialmente la hialuronidasa de la ponzoña de *B. atrox* a través de dos pasos cromatográficos, empleando como primer paso DEAE Sephadex A-50 y Sephadex G-50 obteniéndose purificaciones y rendimientos altos. Al tratar de comparar estos resultados con la presente investigación la cual empleó inicialmente los 2 primeros pasos cromatográficos se observa una purificación de 36 veces y un rendimiento de 30 % en comparación al trabajo de Gonzalez *et.al.*, 2013. Los valores son parecidos, pero a nivel de la cantidad de proteína recuperada nuestro estudio obtiene un 2.6% de proteína activa con respecto al 0.5% encontrado en el trabajo de Gonzalez, también esto se debe a que en nuestro trabajo realizó un tercer paso cromatográfico. La hialuronidasa de *B. atrox* se trataría como una proteína básica con un punto isoeléctrico (pI) mayor a 6, este dato se corroboró mediante programas bioinformáticos los cuales dieron un valor de pI de 9.19.

La bibliografía especializada reporta datos del punto isoeléctrico (pI) para las hialuronidasas de reptiles así *Agkistrodon acutus* con un pI de 10.3, *Agkistrodon contortrix contortrix* con un pI de 9, para las isoformas de *Naja Naja* se obtuvo para la NNH1 un pI de 9.2 y para la NNH2 un valor 9.7 y para el lagarto *Heloderma horridum horridum* un pI de 5.1. Como se observa nuestro valor de pI se encuentra en el promedio obtenido en otras especies.

La Hyal-Ba mostró un 13% de contenido de carbohidratos asociado con un mayor porcentaje de hexosas y hexosaminas. Las hialuronidasas de *Lachesis muta* (Hurtado *et al.*, 2007) y *Apis mellifera* (Gmachl y Kreil, 1993) mostraron 18% y 7% de carbohidratos, respectivamente. La N-glicosilación es la modificación postraducciona más común encontrada en las hialuronidasas y participa en la actividad catalítica (Horta *et al.*, 2014). Nuestros resultados están en relación con 6 sitios potenciales de glicosilación predichos para Hyal-Ba, que están altamente conservados con otras hialuronidasas de serpiente. Entre estos residuos, Asn⁹⁹ y Asn³⁵⁰ se conservan con hialuronidasa humana. Curiosamente, Asn³⁵⁰ es un sitio invariante de N-glicosilación para hialuronidasas de mamíferos (Chao *et al.*, 2007). Desafortunadamente, no pudimos obtener resultados significativos utilizando PNGasa para estimar el contenido de azúcar.

6.2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

El análisis por PAGE-SDS al 12 %, reveló la presencia de una banda principal equivalente a 69 kDa (Figura 11) tanto en condiciones reductoras como no reductoras, a raíz de ello se probó las actividades amidolítica, proteolítica, fosfolipásica y L-aminoácido oxidasa rutinarias en nuestro laboratorio para identificar posibles enzimas contaminantes, ninguna actividad fue detectada en esos pooles. La banda secundaria de 110 kDa obtenida por Gonzalez *et al.* (2013) es similar a la registrada por Delgadillo *et al.*, (2013) para el veneno de la serpiente peruana *B. brazili* pero mucho mayor a la reportada para *L. muta* en cuyo veneno se han encontrado valores diferentes de peso molecular (47.3 y 65 kDa).

Cevallos *et al.*, (1992) mostró que las hialuronidasas de los vertebrados por lo general son enzimas de peso molecular alto que llegan a ser superiores a los 60 kDa y que en casos excepcionales poseen más de una forma. Se realizaron zimogramas de PAGE-SDS que tenían ácido hialurónico y obtuvieron pesos moleculares de 113 y 137 kDa para el veneno de *Bothrops asper*, 73 y 108 kDa para *Crotalus basilicus* y 115 kDa para *Lachesis muta*. Para el caso de los venenos del escorpión *Heterometrus fulvipes*, las serpientes *Vipera russelli* y *Agkistrodon acutus* se encontraron pesos moleculares de 82, 14 y 33 kDa

respectivamente (Ramanaiah *et al.*, 1990; Pukrittayakamee *et al.*, 1988; Xu *et al.*, 1982). Sin embargo, debemos precisar que los ensayos zimográficos son considerados en la actualidad como cualitativos para los procesos de purificación y a la vez muy informativos para la actividad enzimática.

Así mismo, para la hialuronidasa de *Agkistrodon contortrix contortrix* se encontraron pesos moleculares de 59 y 61 kDa para sus correspondientes isoformas (Kudo y Tu, 2001) mientras en el caso de los elápidos se ha encontrado hialuronidasas de 70 y 52 kDa para la cobra *Naja naja* (Girish, 2004, Girish y Kemparaju, 2005a). No obstante en los análisis del peso molecular de esta enzima encontrada en la ponzoña de la serpiente peruana *Lachesis muta*, se obtuvieron para esta misma especie un peso molecular de 47.3 kDa (Hurtado, 1997) y de 65 kDa (Lerma, 2006) respectivamente; en este caso los autores plantearon varias alternativas posibles para explicar este hecho: presencia de isoformas, la existencia de más de una subespecie por el grado de polimorfismo relacionado a la variabilidad geográfica, proteólisis de la forma original de la enzima. Sin embargo, para la serpiente *B. atrox* es notorio que, siendo una proteína de 69 kDa de peso molecular, el peso de la banda secundaria de 110 kDa reportada en *B. brazili* coincide con el peso obtenido por Gonzalez para *B. atrox* lo que podría manifestarse como un indicio de homología molecular dentro del género *Bothrops*, pero no hay que olvidar que en ambos casos presentaron bandas contaminantes.

Tanto para el caso de *B. atrox* (Gonzalez *et. al.*, 2013) y *B. brazili* (Delgadillo *et. al.*, 2013), el hecho de que se encontró una banda principal de alto peso molecular; lo cual fue evidencia de que la proteína en estudio para el caso de *B. brazili* podría ser monocatenaria y que podría carecer de puentes disulfuros en su estructura, a diferencia de este trabajo, el estudio a nivel molecular de la Hyal-Ba, si posee puentes disulfuros en su estructura.

Revisando el problema de la inestabilidad, la hialuronidasa del veneno de *B. atrox* mostró al igual que sus similares, poca estabilidad en comparación con otras enzimas encontradas en las ponzoñas. Se ha estudiado la inestabilidad de las hialuronidasas del lagarto *H. horridum horridum* (Tu y Hendon, 1983) y de *L.*

muta (Hurtado *et. al.*, 2007) y *B. brazili* (Delgadillo *et. al.*, 2013). En nuestro caso, los ensayos efectuados con la enzima expuesta a temperatura ambiente (20-22°C), mostró que la enzima es activa durante 48 horas teniendo un 41 % de actividad restante en este tiempo, mientras que a las 144 horas la actividad enzimática fue nula. Algo semejante ocurre con el veneno crudo quedando anulada también a las 144 horas (Figura 10).

Como puede notarse los intentos por mejorar las condiciones apropiadas para la purificación y mantener a la enzima activa han permitido lograr mejoras en las técnicas de purificación que se han traducido en resultados como los presentados en esta investigación, sin embargo, la exploración en este aspecto continua en la búsqueda de estabilizadores que permitan conservar la actividad enzimática por tiempos prolongados. Aún cuando no está clara la razón de esta inestabilidad, un camino podría ser la actividad proteolítica presente en el veneno crudo y la tendencia a la denaturación en el medio acuoso que no corresponde al fluido tóxico que constituye el veneno.

Por otra parte, para la enzima en estudio se necesitó establecer un tampón y un pH óptimo apropiados. Los valores obtenidos de pH óptimo para la hialuronidasa presente en las ponzoñas de los reptiles, los cuales se hallan dentro del rango de pH entre 5.0 y 6.0, tenemos como ejemplo de pH óptimo de 5.0 encontrado en la enzima de los venenos de la serpiente asiática *Agkistrodon acutus* (Xu *et. al.*, 1982), del lagarto *Heloderma horridum horridum* (Tu y Hendon, 1983) y en la serpiente peruana *Lachesis muta* (Hurtado *et. al.*, 2007), también se encontró con este mismo pH óptimo las 2 isoformas de la ponzoña de la cobra africana *N. naja* (Girish ,2004; Girish y Kemparaju, 2005a), el pH óptimo para la hialuronidasa de *B.brazili* fue de pH 5.5 mientras que con un pH óptimo de 6.0 tenemos por ejemplo a los venenos estudiados de *Agkistrodon contortix contortix* (Kudo y Tu, 2001) y la serpiente peruana *Bothrops atrox* (Gonzalez *et. al.*, 2013 ; Delgadillo *et. al.*, 2013), con respecto a nuestro estudio, se trabajó con el tampón acetato de amonio 0.1 M midiéndose la actividad con valores de pH entre 5.0 y 6.5 (Figura 12) sin embargo a los pH alcalinos de 7.0 y 8.0 en tampón Tris-HCl la actividad se reduce radicalmente, esto último coincide con los trabajos anteriores sobre la acentuada inestabilidad de la hialuronidasa a pH neutro y

alcalino, en los que normalmente son estables generalmente el resto de los componentes tóxicos de la ponzoña. Aunque este valor de pH óptimo de 6.0 es muy similar con los hallados para enzimas similares, ya que se encuentra en el rango ácido de actividad.

Así mismo, los preincubados que se hicieron con los iones mono y divalentes (Na^+ , K^+ , Cl^- , Br^- , Ca^{2+} y Mg^{2+}) solo mostraron un incremento de la actividad con MgCl_2 , siendo las otras soluciones iónicas poco efectivas al elevar la actividad inicial (Tabla 8). En este aspecto Lerma (2006), estableció los requerimientos de aniones monovalentes tales como Cl^- y Br^- los cuales eran capaces de activar la enzima hialuronidasa de *L. muta* pero este efecto no lo generaban los iones catiónicos como Na^+ y K^+ . Esta es una gran diferencia con otros estudios reportados que sugieren a los cationes monovalentes como activadores y señalan la predominancia del catión Na^+ en la activación de la enzima. Uno de estos estudios es lo reportado para la hialuronidasa de *Agkistrodon contortrix contortrix* (Kudo y Tu, 2001) hicieron una evaluación sobre la acción del NaCl sustentando que para la actividad enzimática necesita estar presente el Na^+ .

En nuestro caso, nuestros esfuerzos han estado dirigidos no tanto a si los iones Na^+ y Cl^- son los responsables de este requerimiento enzimático, aunque a juzgar por los datos de Lerma (2006) el efecto es atribuido al ion Cl^- . El propósito de esta prueba no fue verificar el autentico grado de activación o inactivación de cada ión sino más bien verificar la influencia de las soluciones iónicas que contienen Na^+ , K^+ , Cl^- , Br^- , Ca^{2+} y Mg^{2+} por encima de esta dependencia enzimática.

Aún cuando se podría considerar que la presencia de NaCl interfiere o modifica el resultado final, nuestro propósito fue distinguir si adicionalmente a ello los iones mencionados tienen efecto sobre la actividad enzimática. De acuerdo a los resultados de la Tabla 8; solo el ión Mg^{2+} mostró activación enzimática bajo las condiciones experimentales ya mencionadas. Este resultado fue muy similar al obtenido en *B. brazili* en donde el Mg^{+2} mostró un aumento en la actividad enzimática.

Una amplia gama de compuestos pertenecientes a varias clases de agentes químicos, proteínas, aminoácidos, polisacáridos, glicosaminoglicanos, alcaloides, antioxidantes, agentes anti-inflamatorios y compuestos orgánicos sintéticos han sido investigados por su potencial para inhibir la actividad de la hialuronidasa (Mio *et al.*, 2000 ; Mio y Stern, 2002; Khanum *et al.*, 2005; Salmen *et al.*, 2005; Machiah *et al.*, 2006;. Girish y Kemparaju, 2007).

En nuestro caso los ensayos mostrados en la Tabla 9 con agentes químicos que modifican la actividad de la Hyal-Ba indican una fuerte acción inhibitoria del EDTA, agente quelante que se une a cationes divalentes y relacionados con iones metálicos, por lo que se deduce que precisa de otros iones además de los aniones mono y divalentes que estarían relacionados con la actividad enzimática. Sin embargo, el agente TLCK presentó una acción significativa sobre la actividad de la hialuronidasa; ya que este agente es inhibidor irreversible específico de la tripsina (Ouyang *et al.*, 1974), ya que ejerce su acción mediante la alquilación de los residuos de histidina del sitio activo de algunas proteasas; ya que establecen el papel de la serina como residuo que interviene en el reconocimiento y/o fijación del sitio de clivaje del sustrato y de la preferencia de la enzima hacia los puentes formados por la arginina que aquellos formados por lisina y fenilalanina.

Por su parte el agente alquilante iodoacetato empleado en estos ensayos se observó un grado de inhibición apreciable del 39 % pero solo a la concentración de 12 mM lo cual se debe a que puede estar reaccionando con los grupos sulfhidrilos de las cisteínas restantes ya que en nuestro trabajo se encontró 10 residuos de este aminoácido y se encontrarían presentes en las proteínas de andamiaje como la reportada para la hialuronidasa de *Echis ocellatus* (Harrison *et al.*, 2007). Por otra parte, se emplearon aminoácidos como inhibidores selectivos ya que los reportes de la estructura molecular de la hialuronidasa de los venenos de serpientes han sido recientemente dilucidados. Un estudio realizado por Harrison *et al.* (2007), basado en secuencias de cDNA de la glándula del veneno de *Echis ocellatus*, constituye la primera secuencia completa de una hialuronidasa de veneno de serpiente. La enzima tiene cinco

sitos de N-glicosilación conservados, tres de los cuales parecían tener alto potencial de glicosilación, esta enzima tiene una alta homología del 95 % con las hialuronidasas de los venenos de *E. pyramidum leakeyi*, *B. arietans* y *C. cerastes cerastes*. Cada uno de ellos ha conservado los residuos de la región catalítica (Glu135), las regiones posicionales (Asp133, Tyr206, Tyr253 y Trp328) y las cisteínas de andamiaje (Cys340, Cys211, Cys227, Cys365, Cys370, Cys376 y Cys429). En contraste, la enzima de *E. ocellatus* mostró solamente un 31 a 40 % de homología con las hialuronidasas del veneno de la abeja *Apis mellifera*, la avispa *Vespula vulgaris*, el pez piedra *Synanceja horrida* y del pez globo *Tetraodon nigroviridis*, en comparación con enzimas de mamíferos mostró una alta identidad del 50 % con la hialuronidasa tipo 4 del perro *Canis familiaris*.

En varias enzimas ofídicas, se ha demostrado la influencia de los L-aminoácidos en el incremento o reducción de la actividad específica (Roncalla *et. al.*, 2005; Mejía *et. al.*, 2006). Tomándose esto en cuenta se hicieron ensayos con, ácido glutámico, glutatión y glicina para observar inhibición selectiva resultando solo una inhibición significativa en el caso de la glicina (44 %), mientras que los ensayos con glutatión y ácido glutámico mostraron una inhibición pobre de la actividad de menos del 20%. Todos los agentes usados mostraron diferentes grados de inhibición, además es interesante señalar que la inhibición causada por glutatión que fue de 19.5 % a una concentración de 3 mM puede ser atribuible al aminoácido glicina y no a la cisteína ni al ácido glutámico que son los otros integrantes del tripéptido. Los resultados obtenidos para la inhibición de la Hyal-Ba de *B. atrox* podría ajustarse al modelo molecular de la hialuronidasa propuesto por Harrison *et. al.*, (2007) ya que observó inhibición al unirse a los residuos de los aminoácidos Tyr, Cys y Asp.

6.3. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA

Las hialuronidasas clivan al ácido hialurónico del tejido conectivo de la presa o la víctima y permiten la difusión de toxinas del veneno, por esta razón, se les denomina "factor de difusión". De esta manera, desempeñan un papel esencial como mediadores de la toxicidad del veneno, tanto a nivel sistémico como local (Kemparaju *et al.*, 2010). En nuestros resultados demostraron que Hyal-Ba es un

"factor de difusión " porque aumenta la actividad hemorrágica y disminuye el edema (Figura 15). Se han encontrado resultados similares con las hialuronidasas de *Cerastes cerastes* (Wahby *et al.*, 2012) y de *Crotalus durissus terrificus* (Bordon *et al.*, 2012) denominadas CcHasell y CdHya1 respectivamente; Además en el trabajo de Gonzalez (2013) se vió que la hialuronidasa de *B. atrox* aumenta el halo hemolítico del veneno crudo en el ensayo de placa de agar-sangre.

Con respecto con los ensayos de toxicidad inoculando la Hyal-Ba en ratones albinos por vía intraperitoneal y observados durante 48 horas no se manifestó ninguna alteración ni signo de toxicidad (Figura 13). Demostrándose notoriamente que la hialuronidasa no manifiesta toxicidad. Esto también ha sido publicado para las hialuronidasas de *A. acutus acutus* (Xu *et al.*, 1982), *A. contortrix contortrix* (Kudo y Tu, 2001), *L. muta* (Lerma, 2006) y *B. brazili* (Delgadillo *et al.*, 2013). Teniendo estos resultados podemos confirmar que la hialuronidasa no es tóxica en la naturaleza, contrariamente a los principios tóxicos de las ponzoñas de serpientes (Girish , 2004).

Por otro lado, al comparar la actividad hemorrágica del veneno de *B. atrox* siguiendo la metodología de Kondo *et al.*, (1960) variado por Isla *et al.*, (2003), en cuanto a las áreas hemorrágicas producidas al inocular las muestras antes descritas se observan en la Figura 14. Las muestras con veneno crudo produjeron 9.7 ± 0.5 mm de diámetro hemorrágico, esto es muy aproximado y confirma el valor de DHM encontrado por Segura *et. al.* (2010), mientras que en la muestra de veneno calentado se observó un pequeño halo hemorrágico con diámetro de 3 ± 0.3 mm reflejando que esta acción podría deberse que a pesar de estar inactivado por calor puede haber función de algunas metaloproteasas hemorrágicas remanentes; la muestra con la enzima en estudio no produce ningún halo hemorrágico. En cambio, en los casos de adición de la Hyal-Ba sobre el veneno total y al veneno calentado, se observó un mayor grado hemorrágico con valores de 12 ± 0.5 mm y 5 ± 0.4 mm de diámetro hemorrágico respectivamente, lo que sería atribuible a la acción difusora de las hemorraginas causada por la hialuronidasa en estudio (Figura 14).

Se demostró la reactividad antigénica de la Hyal-Ba del veneno de *B. atrox* empleando la técnica de inmunodifusión, frente al suero antibotrópico polivalente se observa una única línea de precipitación (Figura 16). Esta propiedad de la enzima también ha sido reportada por ejemplo en la hialuronidasa estudiada de *B. brazili* (Delgadillo *et. al*, 2013). Esta antigenicidad para la Hyal-Ba puede deberse a su peso molecular (~ 50 kDa), ya que en este caso incrementa la posibilidad de enfrentar a un gran número de determinantes antigénicos frente al antiveneno como a su propiedad glicoproteica.

En los estudios realizados por Gonzalez *et al*. 2013, se observaron que los antivenenos botrópicos y lachésicos neutralizan la acción hialuronidasa del veneno total y de la enzima de *B. atrox* teniéndose en cuenta que los sueros antiofídicos son productos biológicos que contienen anticuerpos específicos que neutralizan las actividades con mayor toxicidad y con responsabilidad en la sintomatología de la mordedura de serpientes. Es de importancia recalcar que la neutralización de la actividad hialuronidasa también se da al trabajar con sueros aviares obtenidos por la tecnología de las IgY, dato muy fundamental para diseñar nuevos sueros antiofídicos y que no han sido investigados antes. La entrada de hialuronidasa en el torrente sanguíneo y la degradación del ácido hialurónico circulante tiene el potencial de causar un colapso sistemático de la víctima envenenada. La neutralización efectiva de la actividad hialuronidasa en compartimentos de tejido vascular, es una prioridad clínica alta. Sin embargo, los antivenenos o sueros antiofídicos generan una baja protección frente a los daños locales del tejido en donde ocurrió la mordedura.

Actualmente se realizan neutralizaciones experimentales de la hialuronidasa y se ha dado mediante anticuerpos monoclonales y derivados de plantas (Girish 2004; Girish y Kemparaju, 2005b) los cuales han demostrado ser eficaces en la inhibición del daño tisular inducido por el veneno y su letalidad. La inestabilidad de las hialuronidasas de los vertebrados por la carencia de detergentes e inhibidores de proteasas (Csoka *et al.*, 2001) y la labilidad térmica (Pukrittayakamee *et al.*, 1988), pueden resultar en el desarrollo débil o insuficiente de anticuerpos específicos sobre la hialuronidasa. Para hacer frente a esta deficiencia clínica potencialmente grave, se espera generar antivenenos

específicos sobre la hialuronidasa en camellos para aprovechar la capacidad de penetración al tejido de los fragmentos VHH de las IgG de camélidos (Cortez-Retamozo *et al.*, 2002), para neutralizar el efecto destructivo sobre los tejidos y utilizar las IgG para neutralizar cualquier efecto sistémico.

La inestabilidad de esta enzima es una gran preocupación, por lo que se ha propuesto clonar y expresar la hialuronidasa del veneno de serpientes como un inmunógeno recombinante para producir anticuerpos específicos. Desde el punto de vista terapéutico, los estudios han demostrado que un anticuerpo producido contra hialuronidasa del veneno de una sola especie de víboras es probable que proporcione neutralización poli-específica de la acción de la hialuronidasa.

En relación al poder neutralizante de los antisueros botrópicos polivalente y lachésico monovalente se pueden extraer algunos aspectos de alto interés. En primer lugar, es necesario recordar que ambos sueros fueron producidos por el INS-Perú, en el caso del antiveneno botrópico el mismo está preparado para neutralizar el veneno de la serpiente *Bothrops atrox* entre otros venenos del género *Bothrops*, en cambio el suero antilachésico es producido específicamente contra la ponzoña de *Lachesis muta*, sin embargo, la cercanía inter-específica y los cuadros clínicos del envenenamiento son similares.

Se ha reportado anteriormente la neutralización por el suero antibotrópico polivalente sobre las actividades de otras enzimas de las ponzoñas de serpientes del género *Bothrops*, lo cual se observó en el caso de *B. brazili* (Delgadillo *et. al.*, 2013) que a 1/2, 1 y 2 dosis la hialuronidasa fue inhibida completamente (Mendoza *et. al.*, 2008), mientras Gonzalez (2013) observó el nivel de neutralización de la hialuronidasa de la ponzoña de *B. atrox* producida por el efecto de los sueros antibotrópicos y antilachésicos de procedencia equino y aviar, no obstante, esto nos indica que teniendo una baja reactividad cruzada estos sueros neutralizan la actividad de esta enzima. Esto comprometería que por lo menos para las hialuronidasas de *B. atrox* y *B. brazili* es legítimo emplear cualquiera de los 2 sueros, esto exige también profundizarnos más en este tema.

6.4. CARACTERIZACION MOLECULAR.

El ensamblaje de los segmentos obtenidos permitió la identificación de una secuencia constituida por 2020 pares de bases (pb) la cual se encuentra guardada en la base de datos del GenBank del NCBI teniendo como código de acceso: KY499627, el análisis por BLASTn, evidenció una notoria homología con otras secuencias pertenecientes a hialuronidasas de origen ofídico depositadas en la base de datos siendo la más homóloga la hialuronidasa de *Protobothrops mucrosquamatus* (GenBank: XM_015822281) con una identidad del 95 % y una longitud de cobertura del 98 %.

El programa Signal P predijo un péptido señal de 20 aminoácidos en la posición N-terminal (Figura 21), los 429 aminoácidos restantes conforman a la proteína madura que al ser analizadas con el programa BLASTp determinan homología con otras hialuronidasas siendo la hialuronidasa de *Bothrops moojeni* (ATU85542) la de mayor identidad (98%) con una longitud de cubierta del 100%. La secuencia proteica de *Bothrops atrox*, producida en el presente estudio, fue denominada como Hyal-Ba y también se encuentra guardada en la base de datos con su respectivo código de acceso: AUF71538.

El estudio realizado por Harrison *et al.*, basado en secuencias de cDNA de la glándula del veneno de *Echis ocellatus*, constituye la primera secuencia completa de una hialuronidasa de la ponzoña de serpiente. La hialuronidasa de esta serpiente posee seis sitios de N-glicosilación conservados, tres de los cuales parecen tener alto potencial de glicosilación, esta enzima tiene una alta homología del 95 % con las hialuronidasas de los venenos de *E. pyramidum leakeyi*, *B. arietans* y *C. cerastes cerastes*. Cada uno de ellos ha conservado los residuos de la región catalítica (Glu135), las regiones posicionales (Asp133, Tyr206, Tyr253 y Trp328) y los scaffold de cisteínas (Cys340, Cys211, Cys227, Cys365, Cys370, Cys376 y Cys429). En nuestro caso la hialuronidasa de *B. atrox* también tiene como región catalítica (Glu135) y las mismas regiones posicionales observándose una alta homología a nivel molecular con las enzimas mencionadas.

En este trabajo obtuvimos la secuenciación de cDNA y la predicción de la secuencia aminoacídica para Hyal-Ba. La alineación de la secuencia de Hyal-Ba con otras hialuronidasas mostró una alta homología de su estructura primaria, especialmente con BATXHYAL1, la hialuronidasa de *B. atrox* de Brasil (Acceso: JAV01892) y BmooHyal-1 de *B. moojeni* (Acceso: ATU85542). Seis residuos diferentes están presentes en Hyal-Ba con respecto a BATXHYAL1 en las posiciones 150 (K → E), 167 (Q → R), 169 (F → Y), 192 (H → Q), 200 (P → T) y 232 (I → V); sin embargo, cada cambio se mantiene dentro del mismo grupo de aminoácidos. Por otro lado, los residuos conservados estaban principalmente involucrados en la estructura terciaria de las proteínas.

Las cisteínas y los enlaces disulfuro estaban altamente conservados en el esqueleto de la proteína. Según Harrison *et al.*, los enlaces disulfuro predichos son C27-C320, C191-C207, C345-C350, C356-C409. La conservación de las cisteínas entre las hialuronidasas de diversos organismos sugiere que tienen estructuras terciarias similares (Horta *et al.*, 2014). La hendidura del sitio de unión sugiere que los residuos catalíticos (Asp¹²⁹, Glu¹³¹ y Tyr²⁴⁷) se conservan con respecto a hHyal-1. Además, Tyr²⁰², que es importante para la interacción con el ácido hialurónico y otros sustratos, también se conserva en Hyal-Ba (Chao *et al.*, 2007).

Además, el motivo B(X)₇B, relacionado con la unión al ácido hialurónico y que se informó en la hialuronidasa del pez piedra (Ranganathan *et al.*, 2005), también está presente en 4 regiones dentro de la estructura primaria predicha de Hyal-Ba (R149 a R157, R169 a R177, K356 a K364 y K364 a K372), las dos últimas regiones son consecutivas y se conservan en todas las hialuronidasas de venenos de serpientes. Este hecho refuerza la afinidad específica de Hyal-Ba por el ácido hialurónico.

La comparación de los datos moleculares con respecto a los bioquímicos presentados en este estudio, y en los de Gonzáles *et al.*, (2013), determinan una significativa diferencia en el peso molecular, 50 kDa vs 110 kDa vs 69 kDa. La diferencia entre los 50 kDa y 69 kDa podría entenderse desde el punto de vista de las glicosilaciones, las hialuronidasas presentan grados de glicosilación que

oscilan entre el 10 - 30 % y se ha demostrado motivos de N-glicosilación presentes en su secuencia proteica, los estudios de deglicosilación nos dará más información. Con respecto a la banda de 110 kDa, se puede hipotetizar dos razones fundamentales para esta diferencia, la primera es que puede tratarse de una isoforma dimérica *per se*, pero los datos de González *et al.*,(2013), indican que el 2β mercaptoetanol no tiene efecto significativo sobre la actividad, no obstante, estudios con agente reductores más fuertes como el DTT pueden dar más luces al respecto. La segunda opción sería una dimerización en solución, a un pH ácido los residuos de metionina y cisteína (con radical expuesto) tienden a oxidarse y promover la dimerización (Huang *et al.*,2013) por lo que análisis de espectrometría de masas tipo MALDI-TOF podrían explicar el inusual comportamiento.

El análisis filogenético obtenido con secuencias homólogas de Hyal-Ba es similar al reportado por Bharathi *et al.*, (2016). En este trabajo, las hialuronidasas de la familia Viperidae consisten en dos grupos principales, el “Grupo I” (Viperinae) y el “Grupo II” (Crotalinae) divergentes en un nodo común que se derivó de los taxones del grupo externo (Elapidae). Las hialuronidasas de viperidos se conservan mucho más que los de elapidos. Cuatro mutaciones en las posiciones 103, 365, 407, 436, (Tabla 15) colocan el género *Bothrops* como un subgrupo monofilético dentro de los crotalidos.

De acuerdo con la caracterización bioquímica, la secuencia de aminoácidos deducida y el análisis filogenético, Hyal-Ba se considera una enzima glicósido hidrolasa (Familia 56 como se describe en la base de datos de enzimas que son activadas por carbohidratos en www.cazy.org). Este grupo comprende enzimas de veneno y péptidos biológicamente activos que resumen 220 proteínas y sus secuencias que muestran un alto grado de similitud con la proteína de esperma PH-20 que esta involucrada en la adhesión celular.

Dentro de este grupo, las hialuronidasas pueden considerarse herramientas biotecnológicas relevantes con énfasis en el campo médico, ya que algunas de ellas se usan ampliamente en cirugía ortopédica, oftalmología, medicina interna, oncología, dermatología y ginecología. Además, los estudios clínicos han

sugerido que la aplicación tópica o sistémica de hialuronidasas como adyuvantes puede aumentar el índice terapéutico de los fármacos contra el cáncer (Menzel *et al.*,1998).

Las expectativas que han abierto los estudios moleculares son muchas, especialmente en el entendimiento de la estructura y la acción funcional de la enzima hialuronidasa de *Bothrops atrox* en el proceso de envenenamiento y proponer que esta enzima sea una herramienta biotecnológica potencial, para de esta forma, poder diseñar una mejor estrategia de neutralización de los componentes tóxicos de dicha ponzoña.

7. CONCLUSIONES

- Los resultados del presente estudio confirman la existencia de una enzima del tipo hialuronidasa de la serpiente peruana *Bothrops atrox* y su rol difusor de los componentes tóxicos del veneno.
- La Hyal-Ba es una glicoproteína de naturaleza básica que tiene una masa molecular de 69 kDa con un 13% de carbohidratos asociados y un pH óptimo de 6.0.
- La enzima carece de actividad tóxica, pero incrementa la acción hemorrágica del veneno total sobre la piel de los ratones albinos.
- Disminuye la actividad edemática cuando fue agregada a la enzima LAAO y posee una fuerte reactividad antigénica frente al suero antibotrópico polivalente (INS-Perú).
- Los análisis moleculares *in silico* permitieron identificar una secuencia de 2020 pb que codifica una proteína madura de 429 aminoácidos.
- Adicionalmente el análisis de su estructura primaria indicó un peso molecular de 50 kDa y un punto isoeléctrico de 9.19, que nos señalaría la presencia de modificaciones postraduccionales como la glicosilación de la proteína.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Allen AG, Lindsay H, Seilly D, Bolitho S, Peters SE, Maskell DJ. Identification and characterisation of hyaluronate lyase from *Streptococcus suis*. Microb Pathog 2004; 36: 327–335.
- Amorim FG, Morandi-Filho R, Fujimura PT, Ueira-Vieira C, Sampaio SV., 2017 New findings from the first transcriptome of the *Bothrops moojeni* snake venom gland. Toxicon 140, 105-117. doi: 10.1016/j.toxicon.2017.10.025.
- Arming S, Strobl B, Wechselberger C, Kreil G. In vitro mutagenesis of PH-20 hyaluronidase from human sperm. Eur J Biochem. 1997; 247(3): 810-814.
- Baker JR, Dong S, Pritchard DG. The hyaluronan lyase of *Streptococcus pyogenes* bacteriophage H4489A. Biochem J. 2002; 365: 317–322.
- Beckenlehner K, Bannke S, Spruß T, Bernhardt G, Schönenberger H, Schiess W. Hyaluronidase enhances the activity of adriamycin in breast cancer models in vitro and in vivo. J Cancer Res Clin Oncol. 1992; 118: 591-6.
- Bharathi C, Kumar P ,Ibrahim S. Sequence diversity and ligand- induced structural rearrangements of viper hyaluronidase. Mol Biosyst. 2016; 12: 1128-1138.
- Barbaro KC, Knysak I, Martins R, Hogan C, Winkel K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. Toxicon 2005; 45: 489–499.

- Braud S, Bon, C, Wisner A. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie* 2000; 82: 851-859.
- Bordon K, Perino M, Giglio J, Arantes E. Isolation, enzymatic characterization and antiedematogenic activity of the first reported rattlesnake hyaluronidase from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Biochimie* 2012; 94: 2740-2748.
- Campbell J, Lamar W. The venomous reptiles of Latin America. New York, Crustock Publishing Associated, USA; 1989.
- Campbell J, Lamar W. The venomous reptiles of the western hemisphere. Cornell University Press, Ithaca and London. 2004
- Carrillo de Espinoza N e Icochea J. Lista taxonómica preliminar de los reptiles vivientes del Perú. Publicación Mus. Hist Nat "Javier Prado" UNMSM (A) 1995; 30:51.
- Castanheira L, Santos Rodriguez R, Boldrini-Franca J, Fonseca F, Henrique Silva F, Homs-Brandeburgo M. Molecular cloning of a hyaluronidase from *Bothrops pauloensis* venom gland. *Journal of venomous animal and toxins including tropical diseases* 2014; 20:25
- Cevallos M, Navarro-Duque C, Varela-Julia M, Alagon C. Molecular mass determination and assay of venom hyaluronidases by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Toxicon* 1992; 30: 925-930.
- Chain E , Duthie E. Identity of hyaluronidase and spreading factor. *Br J Exp Pathol* 1940; 21: 325-329.
- Chang J, Zavaleta A. Ofidismo en el hospital General de la Merced: estudio retrospectivo de 116 casos. *Diagnóstico* 1987; 20: 115-120.
- Chao KL, Muthukumar L, Herzberg O. Structure of human hyaluronidase-1, a hyaluronan hydrolyzing enzyme involved in tumor growth and angiogenesis. *Biochemistry* 2007; 46(23): 6911-6920.

- Chang NS. Transforming growth factor-beta protection of cancer cells against tumornecrosis factor cytotoxicity is counteracted by hyaluronidase. *International Journal of Molecular Medicine* 1998; 2: 653-659.
- Cheong H, Ranganathan S, Chua KL, Khoo HE. Cloning and molecular characterization of the first aquatic hyaluronidase, SFHYA1, from the venom of Stonefish (*Synanceja horrida*). *Gene* 2005; 346: 71-81.
- Chippaux JP, Williams & White J. Snake venom variability: methods of study results and interpretations. *Toxicon* 1991; 29: 1279–1303.
- Chiu W. Studies on the snake venom enzyme: On the hyaluronidase activity of Formosan snake venoms. *J Yamaguchi Med Ass.* 1960; 9: 1355-1360.
- Condrea E, Barzilay M, De Vries A. Hemolysis and splitting of human eritrocyte phospholipids by snake venom. *Biochim. Biophys* 1964; 80: 60-73.
- Cortez-Retamozo V. Efficient tumor targeting by single domain antibody fragments of camels. *International Journal of Cancer* 2002; 98: 456–462.
- Cruz L, Yarlequé A. Hemólisis de eritrocitos humanos por acción del veneno de *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. *Bol Soc Quím Del Peru* 1984; L(1): 41-48.
- Csoka AB, Frost GI, Wong T, Stern R. Purification and microsequencing of hyaluronidase isozymes from human urine. *FEBS Letters* 1997(a); 417: 307-310.
- Csoka AB, Frost GI, Stern R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biology* 2001; 20: 499-508.

- Csoka TB, Frost GI, Stern R. Hyaluronidases in tissue invasion. *Invas Metasta* 1997(b); 17: 297–311.
- Davies G, Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 1995; 3(9): 853-859.
- da CB Gouveia AI, da Silveira RB, Nader HB, Dietrich CP, GremskiW, Veiga SS. Identification and partial characterization of hyaluronidases in *Lonomia obliqua* venom. *Toxicon* 2005; 45: 403–410.
- Da Silva M.H., Gulmerme O., 1981. Titration of antiserum to South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom by measuring inhibition of phospholipase A2 activity. *Toxicon* 20, 563-569.
- da Silveira, Chaim OM, Mangili O, Gremski W, Dietrich C, Nader H, Veiga S. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-beta-N-acetyl-d- hexosaminidases hydrolases. *Toxicon* 2007; 49(6): 758-768.
- DeAssis CM, Gandra RF, Gambale W, Shimizu MT, Paula CR. Biosynthesis of chondroitinase and hyaluronidase by different strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Microbiol* 2003; 52: 479–481.
- Dechert TA, Ducale AE, Ward SI, Yager DR. (2006) Hyaluronan in human acute and chronic dermal wounds. *Wound Repair Regen.* 14:252-8.
- Delgadillo, J., Palomino, M., Lazo, F., Rodríguez, E., González, E., Severino, R., Yarlequé, A. (2013) Purificación y algunas propiedades de una hialuronidasa de la serpiente *Bothrops brazili* “JERGON SHUSHUPE”. *Rev Soc Quim Perú* 2013; 79(4):348-358.
- Delpech B, Girard N, Bertrand P, Courel M.N, Chauzy C, Delpech A. Hyaluronan: fundamental principles and applications in cancer. *J Intern Med.* 1997; 242: 41-8.

- Di-Ferrante N. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *Medical Research*. 1955; 303-306.
- Duran-Reynals F. The invasion of the body by animal poisons. *Science* 1936; 83: 286-287.
- Duran-Reynals F. A spreading factor in certain snake venoms and its relation to their mode of action. *J exp Med*. 1939; 69: 69-81.
- El-safory N, Fazary A & Lee C. Hyaluronidases, a Group of Glycosidases: Current and future perspectives. *Carbohydrate polymers* 2010; 81 (2): 165-181.
- Estevao-Costa MI, Gontijo SS, Correia BL, Yarleque A, Vivas-Ruiz D, Rodrigues E, Chávez-Olortegui C, Oliveira LS, Sanchez EF., 2016; Neutralization of toxicological activities of medically-relevant *Bothrops* snake venoms and relevant toxins by two polyvalent bothropic antivenoms produced in Peru and Brazil. *Toxicon* 2016; 122: 67-77.
- Etesse B, Beaudroit L, Deleuze M, Nouvellon E, Ripart, J. Hyaluronidase: Here we go again. *Annales Francaises d'Anesthesie et de Reanimation* 2009; 28, 658-665
- Favilli G. Mucolytic effect of several diffusing agents and of a diazotized compound. *Nature* 1940; 145: 866-867.
- Favilli G. Occurrence of spreading factor and some properties of hialuronidases in animal parasites and venoms, in: Buckley E. and Porges N. (eds.): *Venoms*. American Association for the Advancement of Science Washington D C 1956; 281 – 289.
- Fraser JRE, Laurent TC, Laurent UBG. Hyaluronan: its nature, distribution, function and turnover. *J Intern Med* 1997; 242:27–33.

- Frost GI, Csoka T, Stern R. The hyaluronidases: A chemical, biological and clinical overview. Trends Glycosci. Glycotechnol 1996; 8:419–34.
- Fry BG, Scheib H, van der Weerd L, Young B, Mcnaughtan, Ramjan SF, Vidal N, Poelmann RE, Norman JA. Evolution of an arsenal: structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). Mol Cell Proteomics 2008; 2: 215-246.
- Fry BG. From genome to “venome”: molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. Genome Res 2005; 15:403–420.
- Garvin J, Chipman D. Subunit structure of testicular hyaluronidase. FEBS Letters 1974; 157-159.
- Gene JA, Gómez M, Gutierrez JM, Cerdas L. Neutralization of hyaluronidase and indirect hemolytic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. Toxicon 1985; 23 (6): 1015 - 1018.
- Girish, K.S., Jagadeesha, D.K., Rajeev, K.B., Kemparaju, K., (2002) Snake venom hyaluronidase: an evidence for isoforms and extracellular matrix degradation. Mol Cell Biochem. 240:105-10.
- Girish KS. Isolation, characterization and inhibition of hyaluronidase from Indian cobra (*Naja naja*) PhD thesis submitted to University of Mysore. 2004.
- Girish KS y Kemparaju K. A low molecular weight isoform of hyaluronidase: Purification from Indian cobra (*Naja naja*) venom and partial characterization. Biochem (Mosc.) 2005a; 70:708–712.
- Girish KS y Kemparaju K. Inhibition of *Naja naja* venom hyaluronidase by plant derived bioactive components and polysaccharides. Biokhimiya. 2005b; 70(8): 1145-1150.

- Girish KS y Kemparaju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sci.* 2007; 80: 1921–1943.
- Gmachl M, Kreil G. Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 3569–3573.
- Gobbi F, Morandi-Filho R, Tieme P, Ueira-Viera C, Vilela S. New findings from the first transcriptome of the *Bothrops mooejeni* snake venom gland. *Toxicon* 2017; 140: 105-117.
- Godoy N. Aislamiento y estudio de algunas propiedades bioquímicas de una hialuronidasa presente en el veneno de la serpiente *Lachesis muta* “shushupe”. (Tesis para optar al Título de Licenciado en Biología) 1992. Universidad Ricardo Palma, Lima-Perú.
- Gonzalez E, Ortiz C, Sandoval G, Lazo F, Delgadillo J, Rodríguez E, Severino R, Yarlequé A. Purificación y caracterización bioquímica de un factor de difusión presente en el veneno de la serpiente *Bothrops atrox* “jergón”. *Rev Soc Quim Perú* 2013; 79(1): 3-12.
- Gregory FI, Tony C, Stern R. The hyaluronidases: a chemical, biological and clinical overview. *Trends Glycosc Glycotechnol.* 1996; 8: 419–434.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98
- Harrison R, Ibson F, Wilbraham D, Wagstaff S. Identification of cDNAs encoding viper venom hyaluronidases: Cross- generic sequence conservation of full length and unusually short variant transcripts. *Gene* 2007; 392: 22-33.
- He H, Li W, Tseng DY, Zhang S, Chen SY, Day AJ, Tseng SCG. Biochemical characterization and function of complexes formed by

hyaluronan and the heavy chains of inter- α -inhibitor purified from extracts of human amniotic membrane. *Journal of Biological Chemistry* 2009; 284: 20136-20146.

- Hoffman DC, Duran-Reynals F. The influence of testicular extract on the intradermal spread of injected fluids and particles. *J Exp Med.* 1931; 53:387–398.
- Hofinger ES, Hoechstetter J, Oettl M, Bernhardt G, Buschauer A. Isoenzyme-especific differences in the degradation of hyaluronic acid by mammalian-type hyaluronidases. *Glycoconj J.* 2008; 25(2): 101-109.
- Hoge RA & Hoge-Romano SARWL. Poisonous snakes of the world. Part I. Check list of the Pit Vipers, Viperioidea, Viperidae, Crotalidae. *Mem Inst Butantan.* 1978-1979; 42/ 43: 179-310.
- Horta CC, Magalhães BEF, Oliveira-Mendes BB, do Carmo AO, Duarte CG, Felicori LF, Machado-de-Ávila RA, Chávez-Olórtegui C, Kalapothakis E. Molecular, immunological, and biological characterization of *Tityus serrulatus* venom hyaluronidase: new insights into its role in envenomation. *Plos Negl. Trop. Dis.* 2014; 8 :e2693.
- Hovingh P, Linker A. Hyaluronidase activity in leeches (Hirudinea). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 1999; 124: 319–326.
- Huang X, Barnard J, Spitznagel TM, Krishnamurthy R. Protein covalent dimer formation induced by reversed-phase HPLC conditions. *J Pharm Sci.* 2013 Mar;102(3):842-51. doi: 10.1002/jps.23431. Epub 2012 Dec 26.
- Huatuco S, Escobar E, Yarlequé A. Aislamiento y caracterización parcial de una miotoxina del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* (Ophidia: Viperidae). *Rev Peru Biol.* 2004; 11 (1): 79-86.
- Hurtado L, Lerma L, Rodríguez E y Yarlequé A. Evaluación Aislamiento y algunas propiedades bioquímicas de una hualuronato glucanohidrolasa

del veneno de la serpiente Peruana *Lachesis muta* “shushupe”. Rev Soc Quim Perú 2007; 73(4): 226-234.

- Hynes W, Walton S. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. FEMS Microbiol Lett 2000; 183: 201–207.
- Isla M, Málaga O, Yarlequé A. Características bioquímicas y acción biológica de una hemorragina del veneno de *Bothrops brazili*. Anales de la Facultad de Medicina. 2003; 64(3): 159-166.
- Jaworek MW , Schuabb V , Winter R . The effects of glycine, TMAO and osmolyte mixtures on the pressure dependent enzymatic activity of α -chymotrypsin. Phys Chem Chem Phys. 2018 Jan 17; 20(3):1347-1354. doi: 10.1039/c7cp06042d.
- Jedrzejak M.J, Stern R. Structures of vertebrate hyaluronidases and their unique enzymatic mechanism of hydrolysis. Proteins 2005; 61:227-38.
- Johnston J.E, Mixner J.P. Relationship of Hyaluronidase Concentration to Fertility of Dairy Bull Semen. J. Dairy Sci. 1950; 33:847–850.
- Kemparaju K, Girish KS, Nagaraju S. Hyaluronidases, a neglected class of glycosidases from snake venom: beyond a spreading factor. In: Mackessy, S.P. (Ed.), Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles. CRC Press, Boca Raton, Florida 2010, pp. 237-258.
- Kemparaju K, Girish K.S. Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. Cell Biochem Funct. 2006; 24:7-12.
- Khanum SA, Murari SK, Vishwanath B, Shashikanth S. Synthesis of benzoyl phenyl benzoates as effective inhibitors for phospholipase A2 and hyaluronidase enzymes. Bioorg Med Chem Lett 2005; 15:4100–4.
- Kini RM. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. Toxicon 2003; 42: 827-884.

- Kini RM. The intriguing world of prothrombin activators from snake venom. *Toxicon* 2005; 45:1133–1145.
- Klocker J, Sabitzer H, Raunik W, Wieser S, Schumer J. Hyaluronidase as additive to induction chemotherapy in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Lett.*1998; 131: 113-5.
- Koh DCI, Armugam A. and Jeyaseelan, K. 2006. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 3030-3041.
- Kohlhoff M, Borges MH, Yarlequé A, Cabezas C, Richardson M, Sanchez EF. Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus*, *J. Proteomics.* 2015; 75: 2181-2195.
- Kondo H, Kondo S, Ikezawa H, Murata R, Ohsaka A. Studies on the quantitative method for the determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *J Med Sci Biol.* 1960; 13: 43-51.
- Kreil G. Hyaluronidases-a group of neglected enzymes. *Protein Sci.* 1995; 4: 1666–1669.
- Kudo K, Tu AT. Characterization of hyaluronidase isolated from *Agkistrodon contortrix contortrix* (Southern Copperhead) venom. *Arch Biochem Biophys* 2001; 386: 154–162.
- Kumar S, West D.C, Ponting J.M, Gattamaneni H.R. Sera of children with renal tumours contain low-molecular-mass hyaluronic acid. *Int J Cancer.* 1989; 44:445-8
- Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680 – 685.
- Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronan. *FASEB J.* 1992; 6: 2397-2404.

- Lazo F, Vivas-Ruiz DE, Sandoval GA, Rodríguez EF, Kozlova EEG, Costal-Oliveira F, Chávez-Olórtegui C, Severino R, Yarlequé A, Sanchez EF. Biochemical, biological and molecular characterization of an L-Amino acid oxidase (LAAO) purified from *Bothrops pictus* Peruvian snake venom. *Toxicon*. 2017; 139: 74-86. doi: 10.1016/j.toxicon.2017.10.001.
- Lerma LM. Evaluación bioquímica y biológica de una hialuronidasa del veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta*. (Tesis para optar al título profesional de Biólogo con mención en Biología Celular y Genética) 2006. UNMSM, Lima-Perú.
- Li J, Wang Y, Zhang X, Wang S, Zhu H .A hyaluronidase from the Snake Venom of *Agkistrodon Blomhoffii ussurensis* of Changbai Mountain: Isolation and Characterization. *International Journal of Biology* 2010; 2(2): 171-180.
- Lisanti VF. Hyaluronidase activity in human saliva. *J Dent Res*. 1950; 3: 392-395.
- Liu D, Pearlman E, Diaconu E, Guo K, Mori H, Haqqi T, Markowitz S, Willson J, Suy M. Expression of hyaluronidase by tumor cells induce angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 7832 – 7837.
- Liu Y, Staerk D, Nielsen M, Nyberg N, Jäger A. High-resolution hyaluronidase inhibition profiling combined with HPLC–HRMS–SPE–NMR for identification of anti-necrosis constituents in Chinese plants used to treat snakebite. *Phytochemistry* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.09.005>.
- Loayza S, Morante Y, Campos S, Yarlequé A. Enzimas proteolíticas en el veneno de las serpientes peruanas *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. *Bol Soc Quim Peru*. 1985; 52(3): 151-163.

- Lokeshwar V.B, Cerwinka, W.H, Lokeshwar B.L. HYAL1 hyaluronidase: a molecular determinant of bladder tumor growth and invasion. *Cancer Res.* 2005; 65:2243-50
- Lokeshwar V.B, Selzer M.G. Hyaluronidase: both a tumor promoter and suppressor. *Semin Cancer Biol.* 2008; 18:281-7.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193: 265-275.
- Lu G, Kochoumian L, King TP. Sequence identity and antigenic cross reactivity of white face hornet venom allergen, also a hyaluronidase, with other proteins. *J Biol Chem.* 1995; 270: 4457–4465.
- Machiah KD, Girish KS , Gowda TV . A glycoprotein from a folk medicinal plant, *Withania somnifera*, inhibits hyaluronidase activity of snake venoms. *Comp Biochem Physiol.* 2006; 143C:158–61.
- Magalhães M.R, da Silva N.J, Jr Ulhoa C.J. A hyaluronidase from *Potamotrygon motoro* (freshwater stingrays) venom: isolation and characterization. *Toxicon* 2008; 51:1060-7.
- Mahadeswaraswamy YH., Manjula B., Devaraja S., Girish KS., Kemparaju K. *Daboia russelli* venom hyaluronidase: purification, characterization and inhibition by beta-3-(3-hydroxy-4-oxopyridyl) alpha-amino-propionic acid, *Curr. Top. Med. Chem.* 2011; 11: 2556-2565.
- Makris G, Wright JD, Ingham E, Holland KT. The hyaluronate lyase of *Staphylococcus aureus*—a virulence factor? *Microbiology* 2004; 150; 2005–2013.
- Málaga O, Pantigoso C, Yarlequé A, Morante Y, Rodríguez E y Cárdenas J. Estudio comparativo del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* en cautiverio. *Rev Peru Biol* 2000; 2: 161-170.

- Manzel E , Farr C. Hyaluronidases and its substrate: Biochemistry, biological activities and therapeutic uses. Cancer Lett 1998; 131:3–11.
- Markovic-Housley Z, Miglierini G, Soldatova L, Rizkallah PJ, Muler U, Schirmer T. Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. Structure Fold Des 2000; 8: 1025–1035.
- Martínez-Vargas, AZ. Mordedura de serpiente (Ofidismo): un problema de salud en el Perú. Rev. Med. Hered. 2004; 15.
- Matysiak J, Schmelzer C, Neubert R, Kokot Z. Characterization of honeybee venom by MALDIT-TOF and nanoESI-QqTOF mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis 2011; 54: 273-278.
- McCrone JD. Spider venoms. Biochemical aspects. A Zool 1969; 9: 153-156.
- Mejia J, Inga R, Rodríguez E, Yarleque A, Zavaleta A. Purificación y propiedades bioquímicas de una fosfolipasa A del veneno de la serpiente *Lachesis muta* “Shushupe”. Rev Soc Quim Perú 2006; 72(2):86-95.
- Mendoza J, Lazo F, Yarlequé L, Ruiz N, Yarlequé A, Pessah S, Flores V, Bonilla C. Efecto del antiveneno botropico sobre las actividades de Fosfolipasa A2 , L- aminoácido oxidasa y hialuronidasa de los venenos de serpientes peruanas. Rev Peru Med Exp Salud Pública 2008; 25(2): 174-178.
- Meyer K. Hyaluronidases In: Boyer, P.D. (Ed.), The enzymes. Academic press New York.1971; pp: 307-320.
- MINSA, Ministerio de Salud. Centro Nacional de Epidemiología. Prevención y Control de Enfermedades. www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2017/SE03/ofidismo.pdf

- Mio K, Carrete O, Maibach H, Stern R. Evidence that the serum inhibitor of hyaluronidase may be a member of the inter-alfa-inhibitor family. The journal of biological chemistry. 2000; 275 (42):32413-32421.
- Mio K, Stern. Inhibitors of hyaluronidases. Matrix Biology. 2002; 21:31-37.
- Mohamed AH, Kamel A, Ayobe MH. Hyaluronidase activity of Egiptian snake and scorpion venoms. Ain Shams Med J. 1973; 24: 445-448.
- Molander M, Nielsen L, Sogaard S, Staerk D, Ronsted N, Diallo D, Chifundera KZ, van Staden J, Jäger AK. Hyaluronidase, phospholipase A2 and protease inhibitory activity of plants used in traditional treatment of snakebite-induced tissue necrosis in Mali, DR Congo and South Africa. J Ethnopharmacol. 2014; 157:171-180.
- Morey SS, Kiran KM, Gadag JR. Purification and properties of hyaluronidase from *Palamneus gravimanus* (Indian black scorpion) venom. Toxicon 2006; 47, 188-195.
- Nagaraju S, Mahadeshwaraswamy YH, Girish KS, Kemparaju K. Venom from spiders of the genus *Hippasa*: Biochemical and pharmacological studies. Comp Biochem Physiol 2006; 144C:1–9.
- Nair RB, Kurup PA. Glycosaminoglycans in the venoms of the South-Indian scorpion, *Heterometrius scaver*. Indian J Biochem Biophys 1973; 10: 133-135.
- Navarrete M, Silva W, Vargas E. Las serpientes venenosas de importancia en la salud pública del Perú. Rev Elec Vet. 2010; 11. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63614251014>
- Ng HC, Ranganathan S, Chua KL, Khoo HE. Cloning and molecular characterization of the first aquatic hyaluronidase, SFHYA1, from the venom of stonefish (*Synanceja horrida*). Gene. 2005; 346: 71–81.

- Noble PW. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biology*. 2002; 21: 25-29.
- Núñez V, Cid P, Sanz L, De La Torre P, Angulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM, Calvete JJ. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. *J Proteomics*. 2009 Nov 2;73(1):57-78. doi: 10.1016/j.jprot.2009.07.013. Epub 2009 Aug 6.
- Ortiz C, Lazo F, Bellido C, Gonzales E, Yarlequé A. Variation of the enzymatic activity of *Bothrops atrox* "jergon" snake venom from three geographic regions, Peru. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2012; 29: 198-205.
- Ouchterlony O & Nilsson L. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: *Handbook of Experimental Immunology*, Vol. 1, Immunochemistry (Weir, D.M., De). Oxford: Blackwell Scientific Publications 4ta. Ed. 1978:32.1-32.50.
- Pesantes O. Prevención y Tratamiento de Accidentes por Serpientes Venenosas. Oficina de Relaciones Públicas SEDAPAL 2000, Lima-Perú.
- Pessini AC, Takao TT, Cavalheiro EC, et al. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon* 2001; 39: 1495–1504.
- Platt VM, Szoka FC. Anticancer therapeutics: targeting macromolecules and nanocarriers to hyaluronan or CD44, a hyaluronan receptor. *Mol Pharm*. 2008; 5(4): 474-486.
- Poh CH, Yuen R, Chung MC, Khoo HE. Purification and partial characterization of hyaluronidase from Stone fish (*Synanceja horrida*) venom. *Comp Biochem Physiol* 1992; 101: 159–163.

- Ponce-Soto LA, Bonfim VL, Novello JC, Navarro R, Yarlequé A, Marangoni S. Isolation and characterization of a serine protease, Ba III-4, from Peruvian *Bothrops atrox* venom. Protein J. 2007 Sep;26(6):387-94.
- Ponnuraj K, Jedrzejewski MJ. Mechanism of hyaluronan binding and degradation: structure of *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase in complex with hyaluronic acid disaccharide at 1.7 Å resolution. J Mol Biol. 2000; 299: 885–895.
- Prehm P. Release of hyaluronate from eukaryotic cells. Biochemical Journal 1990; 267: 185-189.
- Prehm P. Hyaluronate is synthesized at plasma membranes. Biochemical Journal 1984; 220: 597-600.
- Prehm P. Biosynthesis of hyaluronan: direction of chain elongation. Biochemical Journal 2006; 398: 473-496.
- Prestwich GD. Hyaluronic acid-based clinical biomaterials derived for cell and molecule delivery in regenerative medicine. J Control Release 2011; 155(2):193-199.
- Pukrittayakamee S, Warrell DA, Desakorn V, McMichael AJ, White NJ, Bunnag D. The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venoms. Toxicon 1988; 26: 629–637.
- Ramanaiah M, Parthasarathy PR, Venkaiah B. Isolation and characterization of hyaluronidase from scorpion (*Heterometrus fulvipes*) venom. Biochem Int 1990; 20: 301-310.
- Rash LD, Hodgson WC. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. Toxicon 2002; 40: 225–254.

- Reitinger S, Laschober GT, Fehrer C, Greiderer B, Lepperdinger G. Mouse testicular hyaluronidase-like proteins SPAM1 and HYAL5 but not HYALP1 degrade hyaluronan. *Biochem J.* 2007; 40(1): 79-85.
- Roncalla R y Yarlequé A. Efecto del ácido glutámico sobre algunas enzimas de los venenos de serpientes. *Bol Soc Quim Per.* 1995; 51(1): 37-39.
- Roncalla R, Rodríguez E, Lerma L, Yarleque A. Purificación parcial y características bioquímicas de acetilcolinesterasa presente en los venenos de las serpientes *Micrurus spixii* y *Hemachatus haemachatus*. *Rev Soc Quim Perú* 2005; 71(4):255-265.
- Rosenfeld G. Symptomatology, pathology and treatments of snake bites in South America. New York: Academic Press 1971; 84-345.
- Salmen S, Hoechstetter J, Kasbauer C, Paper D, Bernhardt G, Buschauer A. Sulphated oligosaccharides as inhibitors of hyaluronidases from bovine testis, bee venom and *Streptococcus agalactiae*. *Planta Medica* 2005; 71:727–32.
- Sanchez EF, Schneider FS, Yarleque A, Borges MH, Richardson M, Figueiredo SG, Evangelista KS, Eble JA. The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake venom acts both on blood vessel ECM and platelets. *Arch Biochem Biophys.* 2010 Apr 1;496(1):9-20. doi: 10.1016/j.abb.2010.01.010. Epub 2010 Jan 25.
- Santhosh MS, Hemshekhar M, Sunitha K, Thushara RM, Jnaneshwari S, Kemparaju K, Girish KS. Snake venom induced local toxicities: plant secondary metabolites as an auxiliary therapy. *Mini Rev Med Chem* 2013; 13(1): 106-123.
- Schanbacher FL, Lee CK, Wilson IB, Howell DE, Odell GV. Purification and characterization of tarantula *Dugesiella hentzi* (Girard) venom hyaluronidase. *Comp Biochem Physiol* 1973; 44B: 389–396.

- Scopes R.K. Measurement of protein by spectrophotometry at 205-nm, Anal. Biochem. 1974; 59: 277-282.
- Segura A, Castillo MC, Núñez V, Yarlequé A, Gonçalves LR, Villalta M. Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medical – relevant *Bothrops* snake venoms. Toxicon. 2010;56(6):980-9.
- Shimuzu MT, Almeida NQ, Fantinato V, Unterkircher CS. Studies on hyaluronidase, chondroitin sulphatase, protease and phospholipase secreted by *Candida* species. Mycoses 1996; 39: 161–167.
- Shuster S, Frost G.I, Csoka A.B, Formby B, Stern R. Hyaluronidase reduces human breast cancer xenografts in SCID mice. Int. J. Cancer 2002; 102:192–197.
- Siddiky SA, Malo AK , Wahab A , Islam MZ & Rahman A. Tulip liposuction in plastic surgery. Mymensingh Med J. 2002; 11 (2): 82 - 6.
- Sierra MC, Bernal Pérez M. Serpientes exóticas: nueva moda, nueva urgencia. Medicina Intensiva 2001; 25:34-5.
- Sivaramakrishnan V, Ilamathi M, Girish KS, Kemparaju K, Rangappa KS, Dhananjaya BL. Viper venom hyaluronidase and its potential inhibitor analysis: a multipronged computational investigation. J Biomol Struct Dyn.2017; 35: 1979-1989. doi: 10.1080/07391102.2016.1203820
- Smith K. J, Skelton H.G, Turiansky G. and Wagner K.F. Hyaluronidase enhances the therapeutic effect of vinblastine in intralesional treatment of Kaposi's sarcoma. J Am Acad Dermatol.1997; 36: 239-42
- Spruß T, Bernhardt G, Schönenberger H, Schiess W. Hyaluronidase significantly enhances the efficacy of regional vinblastine chemotherapy of malignant melanoma. J. Cancer Res. Clin. Oncol 1995; 121:193-202.

- Stern R, Shuster S, Wiley T.S, Formby B. Hyaluronidase can modulate expression of CD4. *Exp. Cell Res.* 2001; 266:167-76.
- Stern R, Asari A, Sugahara K. Hyaluronan fragments: An information-rich system. *European Journal of Cell Biology.* 2006; 85:699-715.
- Stern R, Jedrzejewski M.J. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem Rev.* 2006; 106:818-39.
- Sutherland IW. Polysaccharide lyases: FEMS Microbiol REV. 1995; 16: 323–347.
- Suzuki R, Shimodaira H. Pvcust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics.* 2006; 22: 1540-1542.
- Sy M.S, Guo Y.J, Stamenkovic I. Inhibition of tumor growth in vivo with a soluble CD44-immunoglobulin fusion protein. *J Exp Med.* 1992; 176:623-7
- Takahashi T, Ikegami-Kawai M, Okuda R, Suzuki K. A fluorimetric Morgan-Elson assay method for hyaluronidase activity. *Analytical Biochemistry* 2003; 322, 257-263.
- Tan N, Tan C. Comparative study of cobra (*Naja*) venom enzymes. *Comp Biochem Physiol.* 1988; 90B: 745–750.
- Tarabini-Castellani G. Recent investigation on diffusion factors in snake venoms: Specificity of the neutralization with immune serum. *Boll Ist Steroter Milan.* 1940; 19: 352-356.
- Tempel C, Gilead A, Neeman M. Hyaluronic acid as an anti-angiogenic shield in the preovulatory rat follicle. *Biol. Reprod.* 2000; 63:134-40.
- Termeer C, Sleeman J, Simon JC. Hyaluronan-magic glue for the regulation of the immune response? *Trends in Immunology.* 2003; 24:112-114.

- Theakston RD, Warrell DA, Griffiths E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*. 2003; 5: 541-557.
- Thompson J.D, Higgins D.G, Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*1994; 22:4673-80
- Toole BP. Hyaluronan is not just a goo. *J Clin Invest*. 2000; 106:335–336.
- Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nature Reviews. Cancer*. 2004; 4: 528-539.
- Tu AT, Hendon RR. Characterization of lizard venom hyaluronidase and evidence for its action as a spreading factor. *Comp Biochem Physiol* 1983; 76B: 337–383.
- Tu A, Passey RB, Toom PM. Isolation and characterization of phospholipase A from snake *Laticauda semifaciata* venom. *Arch. Biochem. Biophys* 1970: 140-196.
- Tu A, Passey RB, Toom PM. Phospholipase a from sea snake venom and its biological properties in De Vries A. and Kouchwa E., Eds. *Toxins of animal and plant origin*. Gordon and Breach. New York. 1971.
- Turakulov YK , Sakhibov DN , Sorokin VM, Yokelson LY. Separation of central-asian cobra venom by means of gel filtration through Sephadex and determination of biological activity of the resulting fractions. *Biokhimiya* 1969; 34: 1119 – 1122.
- Udabage L, Brownlee G.R, Nilsson S.K, Brown T.J. The over-expression of HAS2, Hyal-2 and CD44 is implicated in the invasiveness of breast cancer. *Exp Cell Res*. 2005; 310:205-17.

- Van Helden DF, Thomas PA, Dosen PJ, Imtiaz MS, Laver DR, Isbister GK. Pharmacological approaches that slow lymphatic flow as a snakebite first aid. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2014; 8: 2722
- Vartanian JA, Frankel AS, Rubin MG. Injected Hyaluronidase Reduces Restylane-Mediated Cutaneous Augmentation. Arch Facial Plast Surg. 2005; 7 : 231-237.
- Vivas-Ruiz DE, Sandoval GA, Mendoza J, Inga RR, Gontijo S, Richardson M, Yarleque A, Sanchez EF. Coagulant thrombin-like enzyme (barnettobin) from *Bothrops barnetti* venom: molecular sequence analysis of its cDNA and biochemical properties. Biochimie. 2013; 95: 1476-1486.
- Volfova V, Hostomska J, Cerny M, Votypka J, Volf P. Hyaluronidase of bloodsucking insects and its enhancing effect on leishmania infection in mice. PLoS Negl Trop Dis 2008; 2(9): e294.
- Wahby AF, Mahdy EME, El-Mezayen HA, Salama WH, Abdel-Aty AM, Fahmy AS. Egyptian horned viper *Cerastes cerastes* venom hyaluronidase: purification, partial characterization and evidence for its action as a spreading factor. Toxicon. 2012; 60: 1380-1389. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.08.016.
- Wahby AF, Mahdy EME, EL-Mezayen HA, Salama WH, Ebrahim NM, Abdel-Aty AM, Fahmy AS. Role of hyaluronidase inhibitors in the neutralization of toxicity of Egyptian horned viper *Cerastes cerastes* venom. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 2012; 10: 213–219.
- Warburg O & Christian W. Isolierung und cristallization der Gärungsferments enolase. Biochemische Zertschrift 1941; 31: 384-421.
- Watson D. Hyaluronidase. British Journal of Anaesthesia 1993; 3: 422-425.

- West DC, Hampson IN, Arnold F, Kumar S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science* 1985; 228: 1324-1326.
- Wiezel GA, dos Santos PK, Cordeiro FA, Bordon KC, Selistre-de-Araújo HS, Ueberheide B, Arantes EC. Identification of hyaluronidase and phospholipase B in *Lachesis muta rhombeata* venom. *Toxicon*.2015; 107:359-68. doi: 10.1016/j.toxicon.2015.08.029
- Wright P, Elgert KD, Campbell BJ, Barrett JT. Hyaluronidase and esterase activities of the venom of the poisonous brown recluse spider. *Arch Biochem Biophys*. 1973; 159: 415–426.
- Xu X, Wang X, Xi X, Liu J, Huang J, Lu Z. Purification and partial characterization of hyaluronidase from five pace snake (*Agkistrodon acutus*) venom *Toxicon*. 1982; 20: 973–981.
- Yarlequé M, Ortiz C, Morante Y, Yarlequé A. Estudio comparativo de algunas propiedades químicas de venenos de serpientes de diferentes regiones del mundo. *Rev Soc Quím Perú*. 2012; 78(1): 27-36.
- Yarleque A, Vivas-Ruiz D , Inga R , Rodríguez E, Sandoval GA, Pessah S y Bonilla C. Acción del antiveneno botropico polivalente sobre las actividades proteolíticas presentes en los venenos de serpientes peruanas. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2008. Vol. 25(2): 169-73.
- Yingprasertchai S. Bunyasrisawat S, Ratanabanangkoon K. Hyaluronidase inhibitors (sodium cromoglycate and sodium aurothiomalate) reduce the local tissue damage and prolong the survival time of mice injected with *Naja kaouthia* and *Calloselasma rhodostoma* venoms. *Toxicon* 2003; 42: 635-646.
- Zavaleta A. Producción de veneno cristalizado de serpientes en el Instituto Nacional de Salud (Lima-Perú): Período 1970-1986. *Rev Méd Herediana* 1992; 3: 87.

- Zavaleta A, Vaisberg A, Goñi M. Citotoxicidad inducida por venenos de serpientes peruanas sobre fibroblastos de raton. Rev Biol Trop 1992;40: 143-145.
- Zavaleta A. Mordedura de serpiente (Ofidismo): un problema de salud en el Perú. Rev Med Hered 2004; 15(2): 61-63.
- Zavaleta A y Salas M. Ofidismo: Envenenamiento por mordedura de serpientes. Separata Instituto Nacional de Salud. Perú, 1996.
- Zeller E. Enzymes of snake venoms and their biological significance. Advances in enzymology 1948; 8: 459-495.
- Zeng C, Toole B.P, Kinney S.D , Kuo J.W, Stamenkovic I. Inhibition of tumor growth in vivo by hyaluronan oligomers. Int J Cancer.1998; 77:396-401.